

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Jakub Červenka

Vliv Vps34p na růst a vývoj kvasinkových kolonií

The effect of Vps34p in yeast colony

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce:
RNDr. Michaela Schierová, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně, a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. srpna 2015

Podpis

Tato práce byla vypracována za podpory grantů GAČR 13-08605S “Biofilmové kolonie divokých kvasinek: Vývoj, obranné strategie a regulační dráhy“ a SVV-2015-260209 “Molekulárně buněčný výzkum virů a buněčných organismů“. Práce byla dále podpořena v rámci projektu "BIOCEV - Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy" (CZ.1.05/1.1.00/02.0109), z Evropského fondu pro regionální rozvoj.

Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Michaele Schierové, Ph.D. za trpělivé vedení, laskavý přístup, cenné rady a pomoc po celou dobu mého studia, bez kterých by tato práce nevznikla.

Za jazykové korektury děkuji své manželce Ivě a svému bratrovi Mgr. Janu Červenkoví. Za korektury anglického abstraktu patří díky mé kamarádce Bc. Aleně Kříčkové.

Celé své rodině (zvláště rodičům) a přátelům děkuji za podporu a pochopení nejen při vytváření této diplomové práce, ale v průběhu celého mého studia.

Abstrakt

Fosfatidylinositol-3-kinázová (PI3K) signální dráha je evolučně konzervována u všech eukaryotických organizmů a její hlavní funkcí je regulace autofágie a cílení proteinů do vakuoly/lyzozomu. Pro patogenní kvasinky druhů *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans* je PI3K signální dráha nezbytná pro jejich virulenci. U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je PI3K signální dráha tvořena dvěma proteiny – Vps34p, který je fosfatidylinositol-3-kinázou, a jeho regulátorem Vps15p.

V rámci této diplomové práce jsem se zabýval vlivem PI3K signální dráhy na růst a vývoj kolonií přírodních i laboratorních kmenů *S. cerevisiae*. Ověřil jsem, že delece *VPS34* či *VPS15* má u laboratorních haploidních kmenů významný vliv na velikost kolonií a na invazivní růst (u kmene Σ^h *vps15Δ*). Delece *VPS34* nebo *VPS15* také zvyšuje citlivost buněk k oxidativnímu stresu a detergentům. Kmeny bez *VPS34* odvozené od přírodních kmenů se nepodařilo připravit, pravděpodobně pro jeho esencialitu u těchto kmenů. Konstitutivní exprese *VPS34* neovlivňuje rezistenci buněk při inhibitorových testech, velikost a diferenciaci kolonií ani amoniakovou signalizaci, rozdíly však lze pozorovat v morfologii makrokolonií a způsobu jejich zarůstání do média. Značení Vps34p na C-konci pomocí GFP negativně ovlivňuje funkci Vps34p a u haploidních kmenů vede k fenotypu připomínajícímu deleci *VPS34*. Kvasinka *S. cerevisiae* je také významně odolnější k inhibitoru savčího proteinu Vps34 – KU-55933 než savčí buňky.

Klíčová slova: *Saccharomyces cerevisiae*, vrásčité kolonie, Vps34p, genová exprese, inhibitorové testy

Abstract

The phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signalling pathway is evolutionarily conserved in all eukaryotes and its main function is the regulation of autophagy and protein sorting to the vacuole/lysosome. In the pathogenic yeast species *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* the PI3K signalling pathway is required for virulence. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* the PI3K signalling pathway consists of two proteins – phosphatidylinositol-3-kinase, Vps34p and its regulator Vps15p.

In this diploma thesis I analyse the role of the PI3K signalling pathway in the growth and development of colonies of natural and laboratory strains. I proved that *VPS34* or *VPS15* deletion in haploid laboratory strains has a significant influence on colony size and invasive growth (in strain $\Sigma S^h vps15\Delta$). Deletion of *VPS34* or *VPS15* also increases sensitivity of cells to oxidative stress and detergents. Attempts to delete *VPS34* in natural strains were unsuccessful, probably because *VPS34* is essential in these strains. Constitutive expression of *VPS34* does not affect cell resistance in inhibitory tests, the size and differentiation of colonies or ammonia signalling but differences are notable in giant colony morphology and in patterns of invasiveness of the medium. Tagging of the C-terminal of Vps34p with GFP affects the function of Vps34p negatively and in haploid strains causes a phenotype resembling *VPS34* deletion. The yeast *S. cerevisiae* is also significantly more resistant to KU-55933 (inhibitor of mammalian Vps34) than mammalian cells.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, structured colonies, Vps34p, gene expression, inhibitory tests

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Cíle práce.....	9
3 Přehled literatury.....	10
3.1 Metabolismus fosfoinositidů.....	10
3.1.1 Fosfoinositid-3-kinázy (PI3K).....	12
3.2 Vps34p u kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
3.2.1 Vps34p je PI3K i proteinkináza.....	15
3.2.2 Vps15p – regulační podjednotka Vps34p.....	16
3.2.3 Proteiny interagující s PtdIns3P.....	19
3.2.4 Buněčné procesy spojené s Vps15p a Vps34p.....	23
3.3 Protein Vps34 u jiných organismů.....	27
4 Materiál a metody.....	29
4.1 Materiál.....	29
4.1.1 Použité mikroorganismy.....	29
4.1.2 Připravené kvasinkové kmeny.....	30
4.1.3 Použité plazmidy.....	31
4.1.4 Použité primery.....	32
4.1.5 Použité standardy molekulových hmotností.....	34
4.1.6 Chemikálie.....	34
4.1.7 Enzymy.....	36
4.1.8 Antibiotika.....	36
4.1.9 Ostatní materiál.....	37
4.1.10 Kultivační média.....	37
4.2 Metody.....	38
4.2.1 Sterilizace.....	38
4.2.2 Práce s kvasinkami.....	38
4.2.3 Transformace.....	39
4.2.4 Práce s nukleovými kyselinami.....	43
4.2.5 Southern blot a hybridizace.....	46
4.2.6 Northern blot a hybridizace.....	48
4.2.7 Western blot a imunodetekce.....	52
4.2.8 Charakterizace připravených kmenů.....	55
4.2.9 Software a databáze.....	58
5 Výsledky a diskuze.....	60
5.1 Bioinformatické analýzy.....	60
5.1.1 Analýza genů interagujících s genem <i>VPS34</i> u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
5.1.2 Analýza genů interagujících s genem <i>VPS15</i> u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
5.1.3 Analýza promotoru genu <i>VPS34</i> u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
5.1.4 Analýza regulace transkripce genu <i>VPS15</i> u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	77
5.1.5 Diskuze bioinformatických analýz.....	80
5.2 Analýzy kmenů s delecí genů zapojených do PI3K signální dráhy.....	87
5.2.1 Příprava delečních kmenů odvozených od přírodních kmenů.....	87
5.2.2 Příprava delečních kmenů odvozených od laboratorních kmenů.....	90
5.2.3 Ověření delečních kmenů BY4742 <i>vps15Δ</i> a BY4742 <i>vps34Δ</i> ze sbírky EUROSCARF.....	91
5.2.4 Morfologická analýza kolonií připravených delečních kmenů.....	92
5.2.5 Citlivost delečních kmenů k inhibitorům.....	96
5.2.6 Citlivost buněk <i>S. cerevisiae</i> k inhibitoru KU-55933.....	99
5.3 Analýzy kmenů se zvýšenou expresí <i>VPS34</i>	102
5.3.1 Příprava kmenů s konstitutivní expresí <i>VPS34</i>	102
5.3.2 Northern blot analýza s hybridizací u kmenů s konstruktem <i>TEF-VPS34</i>	102

5.3.3 Morfologická analýza kolonií kmenů s konstruktem <i>TEF-VPS34</i>	107
5.3.4 Citlivost kmenů <i>TEF-VPS34</i> k inhibitorům.....	112
5.3.5 Amoniaková signalizace u kmenů <i>TEF-VPS34</i>	115
5.3.6 Vertikální diferenciaci makrokolonií u kmene BY4742 <i>TEF-VPS34</i>	120
5.3.7. Analýza produkce a lokalizace Flo11p-GFP u kmene BR-F Flo11p-GFP <i>TEF-VPS34</i>	120
5.4 Analýzy kmenů produkujících Vps34p značený pomocí GFP.....	126
5.4.1 Příprava kmenů s konstruktem <i>VPS34-yEGFP</i>	126
5.4.2 Morfologická analýza kolonií kmenů s konstruktem Vps34p-GFP.....	126
5.4.3 Citlivost kmenů produkujících Vps34p-GFP k inhibitorům.....	131
5.4.4 Expres a lokalizace Vps34p-GFP.....	131
5.5 Diskuze experimentální části práce.....	136
5.5.1 Příprava kmenů s delecí <i>VPS34</i> nebo <i>VPS15</i>	136
5.5.2 Morfologie a růst kolonií kmenů s delecí <i>VPS15</i> nebo <i>VPS34</i>	137
5.5.3 Inhibitorové testy kmenů s delecí <i>VPS15</i> nebo <i>VPS34</i>	138
5.5.4 Testování vlivu KU-55933 na kvasinku <i>S. cerevisiae</i>	139
5.5.5 Příprava kmenů se zvýšenou expresí <i>VPS34</i>	141
5.5.6 Vliv zvýšené exprese <i>VPS34</i> na morfologii a růst kolonií.....	144
5.5.7 Inhibitorové testy kmenů se zvýšenou expresí <i>VPS34</i>	143
5.5.8 Amoniaková signalizace a vertikální diferenciaci kolonií u kmenů se zvýšenou expresí <i>VPS34</i>	144
5.5.9 Vliv zvýšené exprese <i>VPS34</i> na produkci a lokalizaci Flo11p.....	144
5.5.10 Příprava kmenů produkujících Vps34p-GFP.....	145
5.5.11 Morfologie a růst kolonií kmenů produkujících Vps34p-GFP.....	145
5.5.12 Inhibitorové testy kmenů produkujících Vps34p-GFP.....	146
5.5.13 Produkce a lokalizace Vps34p-GFP.....	147
5.5.14 Srovnání výsledků bioinformatických analýz a experimentální části práce.....	148
6 Souhrn.....	149
7 Seznam použité literatury.....	150

Seznam zkratek

APP	amyloidní prekurzorový protein (amyloid precursor protein)
BR-F	přírodní diploidní kmen <i>S. cerevisiae</i> (diploid wild strain of <i>S. cerevisiae</i>)
BR-S	domestikovaný diploidní kmen <i>S. cerevisiae</i> odvozený od BR-F (domesticated strain of <i>S. cerevisiae</i> derived from BR-F)
BY4742	laboratorní haploidní kmen <i>S. cerevisiae</i> (haploid laboratory strain of <i>S. cerevisiae</i>)
C2	C-koncová doména (C-end domain)
ChIP-on-chip	imunoprecipitace chromatinu spojená s DNA microarrayi (chromatin immunoprecipitation with DNA microarray)
ChIP-Seq	imunoprecipitace chromatinu spojená se sekvenováním (chromatin immunoprecipitation sequencing)
DAG	diacylglycerol
demi H ₂ O	demineralizovaná voda (demineralized water)
dest. H ₂ O	destilovaná voda (distilled water)
DMSO	dimethylsulfoxid (dimethyl sulfoxide)
EM	ethanolové médium (ethanol medium)
ER	endoplazmatické retikulum (endoplasmic reticulum)
ESR	odpověď na stresové podmínky (environmental stress response)
FYVE	doména pojmenovaná podle Fab1p, YOTB, Vac1p a EEA1 (domain named by Fab1p, YOTB, Vac1p a EEA1)
G418	geneticin
GEF	protein katalyzující výměnu GDP za GTP (guanine nucleotide exchange factor)
GM	glycerolové médium (glycerol medium)
HEAT	helikální doména (helical domain)
<i>KanMX</i>	gen rezistence ke G418 (G418 resistance gene)
LKU	unikátní lipidkinázová doména (lipid kinase unique domain)
MAPK	proteinkinázová dráha aktivovaná mitogenem (mitogen-activated protein kinase)
<i>NATI</i>	gen rezistence k NAT (NAT resistance gene)
NAT	nourseothricin
OD	optická denzita (optical density)
PAS	preautofagozomální struktura (pre-autophagosomal structure)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PI3K	fosfoinositid-3-kináza (phosphoinositide-3-kinase)
PIK	doména homologní s fosfatidylinositol kinázou (phosphatidylinositol kinase homology domain)
PORT	přírodní diploidní kmen <i>S. cerevisiae</i> (diploid wild strain of <i>S. cerevisiae</i>)
PtdIns	fosfatidylinositol (phosphatidylinositol)
PtdIns3/4/5P	fosfatidylinositol-3/4/5-fosfát (phosphatidylinositol-3/4/5-phosphate)
PtdIns(3,5/4,5)P ₂	fosfatidylinositol(3,5/4,5)-difosfát (phosphatidylinositol(3,5/4,5)-diphosphate)
PtdIns(3,4,5)P ₃	fosfatidylinositol(3,4,5)-trifosfát (phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphate)
PX	doména s homologií Phox (Phox homology domain)
ROS	volné kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
RNáza A	ribonukleáza A (ribonuclease A)
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS polyacrylamide gel electrophoresis)
SH2/3	doména homologní se Src typu 2/3 (Src homology domain type 2/3)
SRM	monitorování vybraných reakcí (selected reaction monitoring)
TEF	promotor translačního elongačního faktoru 1α (promotor of translational elongation factor 1α)
TF	transkripční faktor (transcription factor)
<i>VPS</i>	geny spojené s tříděním vakuolárních proteinů (vacuolar protein sorting genes)
v/v	objem/objem (volume/volume)
w/v	hmotnost/objem (weight/volume)
WD-40	repetice tryptofanu a kyseliny asparagové
YD	glukózové médium (glucose medium)
YEPD	komplexní kultivační médium (complex cultivation medium)
ΣS ^h	laboratorní haploidní kmen <i>S. cerevisiae</i> (haploid laboratory strain of <i>S. Cerevisiae</i>)

Názvy genů nebo proteinů jsou vysvětleny jejich anotací v Tab. 5.1 až 5.5.

1 Úvod

Svoji diplomovou práci jsem vypracoval v Laboratoři biologie kvasinkových kolonií na katedře genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Jedním z témat studovaných v rámci této laboratoře je vývoj a morfologie kolonií přírodních diploidních kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. V nepříznivých podmínkách vytvářejí přírodní kmeny často strukturované kolonie, které jsou odolnější vůči vnějším vlivům. Kolonie tvořené přírodními kmeny jsou vhodným studijním modelem biofilmů. Bakteriální či houbové biofilmy jsou významným zdravotním problémem současnosti, který je spojený s nárůstem rezistence vůči klinicky používaným antibiotikům a s výrazným zvýšením nákladů na léčbu pacientů (*Lynch a Robertson, 2008*).

Při kultivaci na glycerolovém médiu indukuje 0,05mM selenan sodný tvorbu strukturovaných kolonií u přírodního kmene PORT, který jinak na glycerolovém médiu vytváří spíše hladké kolonie (*RNDr. Michaela Schierová, Ph.D., nepublikované výsledky*). O působení sloučenin selenu na *S. cerevisiae* však zatím nebylo publikováno mnoho prací. V savcích buňkách sloučeniny selenu často fungují jako regulátory kináz a regulují mimo jiné aktivitu fosfatidylinositol-3-kináz (PI3K) (*Plano et al., 2011*).

U *S. cerevisiae* je PI3K signální dráha tvořena dvěma proteiny – Vps15p a Vps34p. Vps34p je u *S. cerevisiae* jedinou PI3K katalyzující vznik fosfatidylinositol-3-fosfátu (PtdIns3P) (*Schu et al., 1993*). Jeho PI3K aktivita je pozitivně regulována Vps15p (*Stack et al., 1993*). Přestože zpočátku byla PI3K signální dráha spojována pouze s cílením vakuolárních proteáz (*Robinson et al., 1988*) a s regulací autofágie (*Kihara et al., 2001*), výsledky prací z posledních let ukazují, že funkce Vps34p a produktu jeho PI3K aktivity – PtdIns3P jsou značně pleiotropní. Mimo jiné Vps15p a Vps34p ovlivňují délku telomer (*Rog et al., 2005*), podílejí se na buněčné odpovědi na feromon (*Slessareva et al., 2006; Heenan et al., 2009*), jsou nezbytné pro tvorbu strukturovaných kolonií (biofilmů) (*Sarode et al., 2011*) a hrají roli v regulaci transkripce a lokalizaci genů v buněčném jádře (*Gaur et al., 2013*). Analyzovat dostupné informace a vytvořit ucelený obraz o funkcích PI3K signální dráhy u *S. cerevisiae* je jedním z cílů této práce.

Hlavním přínosem této práce je, že se vedle laboratorních kmenů zabývá také kmeny přírodními a zaměřuje se také na vliv konstitutivní exprese *VPS34* na buňky a kolonie. Dosud publikované práce o PI3K signální dráze byly provedeny pouze na laboratorních kmenech a vliv zvýšené exprese *VPS34* byl studován jen okrajově. Výsledky získané studiem přírodních kmenů jsou o to významnější, že Vps34p byl určen jako slibný cíl pro vývoj nových terapií mykotických infekcí způsobených patogenními kvasinkami druhů *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans* (*Bruckmann et al., 2000; Hu et al., 2008*).

2 Cíle práce

- Určit vliv Vps15p a Vps34p na růst a vývoj kvasinkových kolonií u divokých i laboratorních kmenů *Saccharomyces cerevisiae*.
 - Vytvořit z dostupných zdrojů ucelený přehled o Vps34p, jeho regulaci a funkcích u kvasinky *S. cerevisiae*.
 - Analyzovat výsledky experimentů dostupné v databázích a určit buněčné procesy spojené s Vps15p a Vps34p.
 - Připravit kmeny s delecí genů *VPS15*, nebo *VPS34* a kmeny s konstitutivní expresí *VPS34* odvozené od přírodních i laboratorních kmenů *S. cerevisiae*.
 - Sledovat růst a vývoj kolonií připravených kmenů v selektivních i neselektivních podmínkách. Testovat citlivost připravených kmenů k inhibitorům.
 - Připravit kmeny s proteinem Vps34p s C-koncovým značením pomocí GFP.
 - Detekovat produkci proteinů Flo11p-GFP a Vps34p-GFP pomocí imunodetekce, spektrofluorimetrie a fluorescenční mikroskopie.

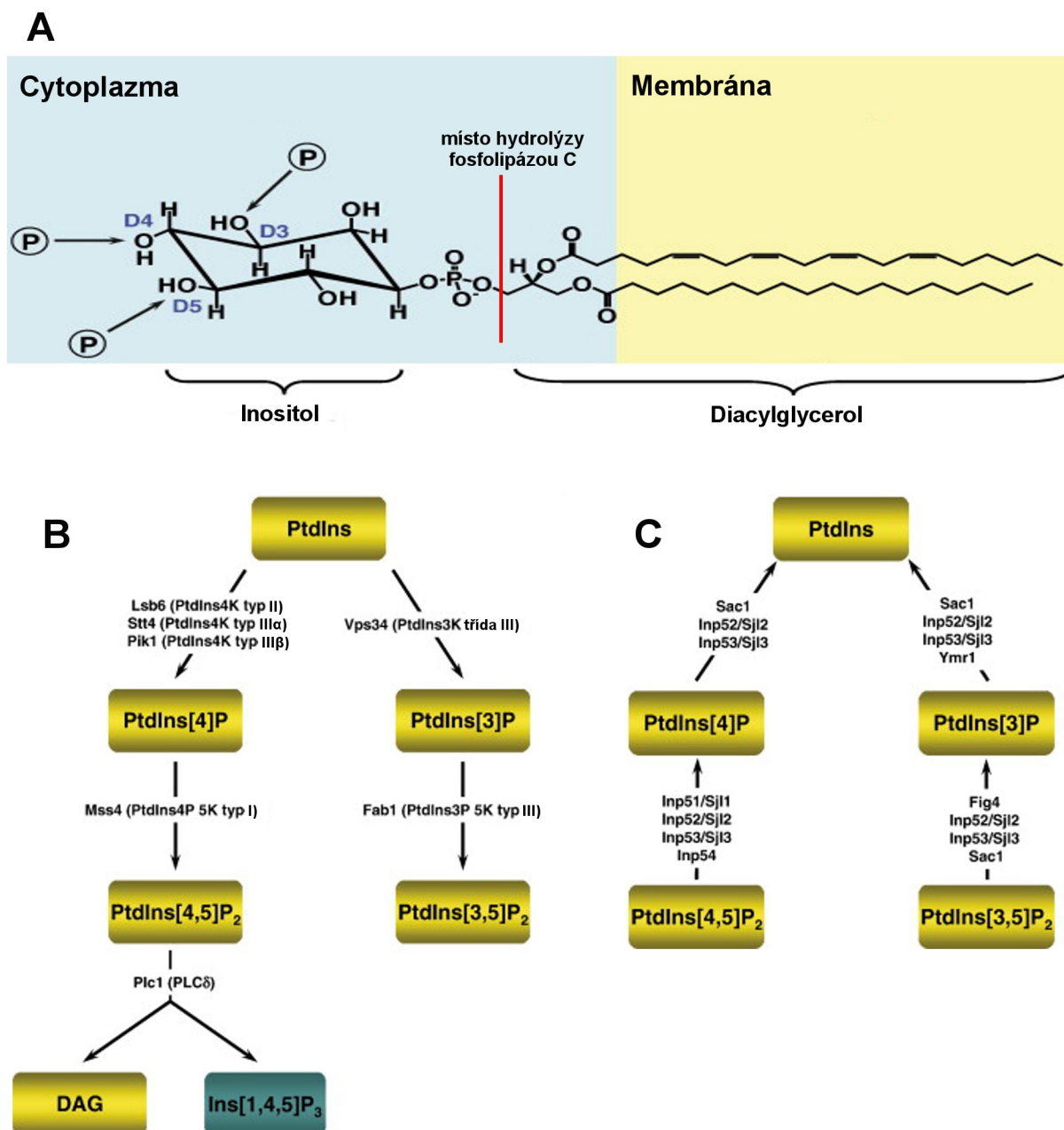
3 Přehled literatury

3.1 Metabolismus fosfoinositidů

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je oblíbeným modelovým organismem pro studium syntézy, transportu a degradace lipidů. Hlavním důvodem (vedle předností *S. cerevisiae* jako jsou kompletně osekvenovaný genom, rychlý růst, levná kultivace, možnost střídání haploidní a diploidní generace atd.) je evoluční konzervovanost lipidového metabolismu u eukaryotických organismů (Klug a Daum, 2014).

Lipidy jsou malé hydrofobní nebo amfipatické molekuly, jejichž uhlíkatá část vzniká buď kondenzací ketoacyl thioesterů (mastné kyseliny, glycerolipidy, glycerofosfolipidy, sfingolipidy, sacharolipidy a polyketidy), nebo isoprenových podjednotek (steroly a prenoly) (Fahy et al., 2011). Díky své četnosti a strukturní i funkční variabilitě hrají mezi fosfolipidy buněčných membrán hlavní roli glycerofosfolipidy. Základním strukturním rysem těchto fosfolipidů je glycerolová kostra, která je esterifikována mastnými kyselinami na hydroxylových skupinách v pozici D1 a D2 a fosforylována na hydroxylové skupině v pozici D3. Takovýto fosfolipid je označován jako kyselina fosfatidová. Přes fosfát na hydroxylové skupině v pozici D3 glycerolu je připojen příslušný alkohol a vzniká fosfatidylethanolamin, fosfatidylglycerol, fosfatidylcholin, fosfatidylinositol, nebo fosfatidylserin (Strahl a Thorner, 2007).

U *S. cerevisiae* je inositol pro biosyntézu fosfatidylinositolu získáván z prostředí s využitím permeáz pro inositol (Itr1p a Itr2p), nebo je syntetizován *de novo* z glukóza-6-fosfátu konverzí na inositol-3-fosfát proteinem Ino1p. Inositol-3-fosfát je následně defosforylován fosfatázou Inm1p na inositol. Membránově vázaná fosfatidylinositolsyntáza (Pis1p) poté katalyzuje reakci CDP-diacylglycerolu a inositolu a vznik fosfatidylinositolu (shrnutí v Greenberg a Lopes, 1996; Klug a Daum, 2014). Procentuální zastoupení fosfatidylinositolu mezi ostatními fosfolipidy se liší v závislosti na původu membrány. Při kultivaci na komplexním médiu (1% kvasničný autolyzát, 3% glukóza, 2% pepton, případně s upraveným složením pro indukci konkrétního typu organel, např. peroxizomů nebo mitochondrií) tvoří fosfatidylinositol 14,6 % fosfolipidů membrán mitochondrií (16,2 % vnitřní membrána, 10,2 % vnější membrána), 7,5 % endoplazmatického retikula, 15,1 % jaderné membrány, 19,1 % endozomů, 18,3 % vakuoly, 15,8 % peroxizomů a 17,7 % cytoplazmatické membrány (Zinser et al., 1991). Složení buněčných membrán je samozřejmě závislé na vnějším prostředí. Při kultivaci *S. cerevisiae* na komplexním médiu (YEPD, 1% kvasničný autolyzát, 2% glukóza, 2% pepton) je 7,8 % všech fosfolipidů fosfatidylinositol. Po přidání 75 μ M inositolu do kultivačního média dojde k nárůstu zastoupení fosfatidylinositolu na 44 % (Kelley et al., 1988).



Obr. 3.1: Struktura fosfatidylinositolu a metabolismus fosfoinositidů u *Saccharomyces cerevisiae*

A – Struktura fosfatidylinositolu včetně vyznačeného místa hydrolýzy fosfolipázou C (Plc1p) a fosforylovatelných hydroxylových skupin (D3, D4 a D5). B – Schéma fosforylačních reakcí fosfoinositidů s vyznačenými lipidkinázami katalyzujícími danou reakci. Rovněž je uvedena hydrolýza PtdIns(4,5)P₂ fosfolipázou C, která generuje druhé posly – diacylglycerol a inositol(1,4,5)-trifosfát. C – Schéma defosforylačních reakcí fosfoinositidů s vyznačenými lipidfosfatázami katalyzujícími danou reakci. Zajímavé je, že zatímco lipid kinázy jsou zcela specifické, lipidfosfatázy obvykle rozeznávají více substrátů. Adaptováno ze Strahl a Thorner, 2007.

Fosfatidylinositol je mezi ostatními glycerofosfolipidy unikátní svým šestičetným inositolovým kruhem, jehož hydroxylové skupiny mohou být fosforylovány lipidkinázami či defosforylovány fosfatázami (Obr. 3.1). Produkty těchto enzymů jsou souhrnně označovány jako fosfoinositidy. Podstatné je, že fosforylace i defosforylace fosfoinositidů jsou reverzibilní reakce

(Strahl a Thorner, 2007). Fosfoinositidy plní tyto 3 základní funkce:

a) Prekursorů druhých posílů. Po štěpení fosfoinositidu fosfolipázou C dojde ke vzniku dvou typů druhých posílů – inositolu se specificky fosforylovanými hydroxylovými skupinami, který je volně v cytoplazmě, a membránově vázaného diacylglycerolu.

b) Vazebná místa pro proteiny. Fosfoinositidy mohou díky různým vzorcům fosforylace sloužit jako specifický cíl pro intracelulární proteiny s vazebnou doménou pro fosfoinositidy, a ovlivňovat tak jejich lokalizaci nebo aktivitu.

c) Stavební složky buněčných membrán. Fosfoinositidy mohou svojí strukturou a fosforylací přímo ovlivňovat topologické a elektrostatické vlastnosti membrán (Fruman et al., 1998).

3.1.1 Fosfoinositid-3-kinázy (PI3K)

Společným rysem fosfoinositid-3-kináz je, že fosforylují hydroxylovou skupinu v pozici D3 fosfatidylinositolu γ -fosfátovou skupinou z ATP (Wymann a Pirola, 1998). Vedle PI3K aktivity mají však tyto enzymy také aktivitu proteinkinázovou (Fruman et al., 1998). Proteiny patřící do rodiny PI3K můžeme podle jejich struktury a organizace proteinových podjednotek rozdělit do 3 základních tříd – viz Obr. 3.2 (Domin a Waterfield, 1997).

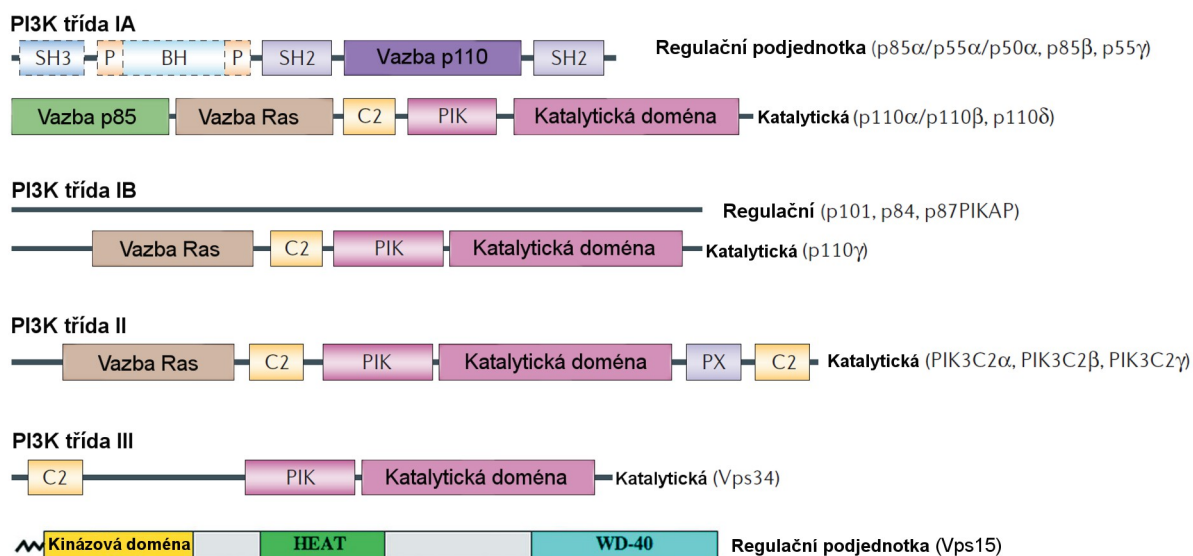
Proteiny PI3K třídy I jsou heterodimery složené z regulační a katalytické podjednotky. Tuto třídu můžeme dále rozdělit na dvě skupiny – třídu IA a třídu IB. Obě skupiny mají homologní katalytickou podjednotku o molekulové hmotnosti ~110 kDa (p110 α , β a δ v případě PI3K IA, p110 γ u PI3K IB), ale strukturně odlišné regulační podjednotky (p50 α , p55 α a γ , p85 α a β , v případě PI3K IA, respektive p101 u PI3K IB). Aktivita PI3K třídy I je regulována extracelulárními signály přes receptory s tyrosinkinázovou aktivitou, receptory spřažené s trimerními G proteiny a receptory spojené s tyrosinkinázami podobnými proteinu Src. Substráty enzymů třídy I *in vitro* jsou fosfatidylinositol (PtdIns), fosfatidylinositol-4-fosfát (PtdIns4P), fosfatidylinositol(4,5)-difosfát (PtdIns(4,5)P₂) a v případě třídy IA ještě fosfatidylinositol-5-fosfát (PtdIns5P). Jako substrát *in vivo* je však preferován PtdIns(4,5)P₂, což je zřejmě dáno dostupností substrátu v buňce. Produktem PI3K typu I je fosfatidylinositol(3,4,5)-trifosfát (PtdIns(3,4,5)P₃) (shrnutí v Domin a Waterfield, 1997; Fruman et al., 1998, Wymann a Pirola, 1998; Backer, 2008).

Do třídy II PI3K patří tři monomerní isoformy o molekulové hmotnosti 170-210 kDa označované jako C2 α , β a γ podle domény C2 na C-konci proteinu, která se u ostatních tříd PI3K nevyskytuje. Jejich substrátová specifita je zřejmě omezena na PtdIns a PtdIns4P, u PI3K C2 α

byl jako substrát prokázán také $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$. Produktem PI3K třídy II je fosfatidylinositol-3-fosfát (PtdIns3P) či fosfatidylinositol(3,4)-difosfát ($\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$) (*shrnutí v Domin a Waterfield, 1997; Fruman et al., 1998, Wymann a Pirola, 1998; Backer, 2008*).

Třída III PI3K je tvořena jediným proteinem – Vps34p, který má striktní substrátovou specifitu pouze k PtdIns a jeho jediným produktem je PtdIns3P . PI3K aktivita Vps34p je regulována proteinem Vps15p (*shrnutí v Fruman et al., 1998, Wymann a Pirola, 1998; Backer, 2008*).

PI3K třídy III (tedy Vps34p, spolu s regulačním proteinem Vps15p) jsou přítomné u všech eukaryotických organismů. Také jejich funkce jako regulátorů váčkového transportu je vysoce evolučně konzervována. Lze tedy předpokládat, že PI3K třídy III byla prvotní eukaryotickou PI3K (*Engelman et al., 2006*).

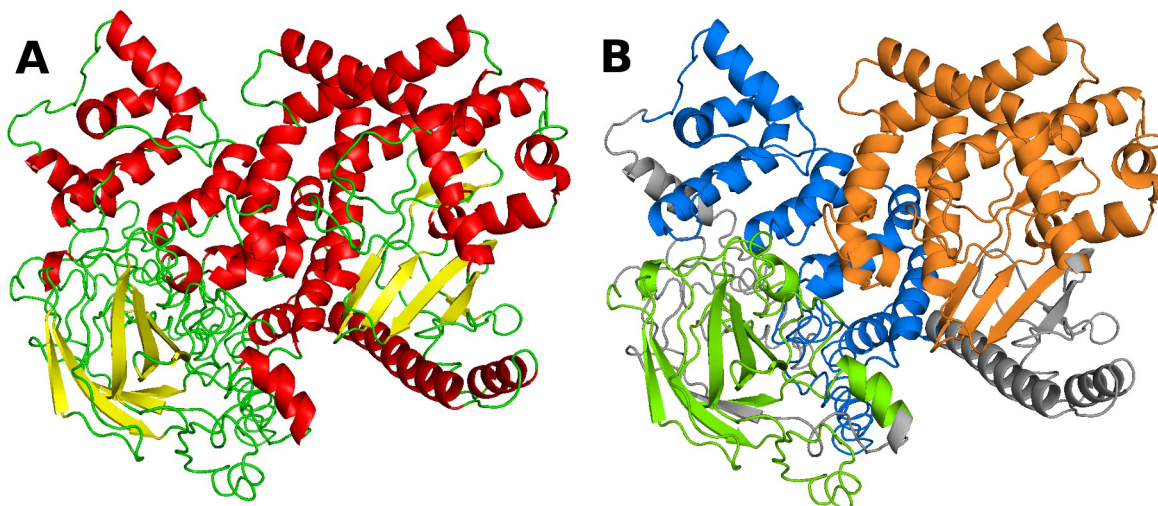


Obr. 3.2: Uspořádání domén PI3K proteinů u savců

Regulační podjednotky PI3K jsou, co se doménového uspořádání týče, vysoce variabilní, jak je patrné u PI3K třídy IA a IB – nesdílejí žádné homologní domény. Regulační podjednotka třídy IA obsahuje doménu zodpovědnou za interakci s katalytickou doménou (Vazba p110), dvě domény homologní se Src typu 2 (SH2, ta umožňuje vazbu na receptory s tyrosinkinázovou aktivitou), doménu homologní se Src typu 3 (SH3), dvě polyprolinové oblasti a doménu homologní s BCR (BH). Pro regulační podjednotky PI3K třídy IB nebyly popsány žádné domény. PI3K třídy II nemají regulační podjednotku. Regulační podjednotka PI3K třídy III obsahuje proteinkinázovou doménu (Kinázová doména), helikální doménu (HEAT) a oblast repetice tryptofanu a kyseliny asparagové (WD-40). N-konec je myristoylován. Všechny katalytické podjednotky PI3K sdílejí 3 společné domény – katalytickou doménu zodpovědnou za fosforylaci substrátu, doménu homologní s fosfatidylinositolkinázou (PIK) a doménu C2. PI3K třídy I a II mají ještě vazebnou doménu pro Ras protein (Vazba Ras), která umožňuje jejich aktivaci. Třída IA obsahuje na N-konci ještě vazebnou doménu pro svoji regulační podjednotku (Vazba p85). PI3K třídy II mají C-konec odlišný od všech ostatních PI3K, který nese doménu homologní s Phox (PX) a další doménu C2. Názvy v závorkách za jednotlivými podjednotkami jsou názvy těchto proteinů u savců. Adaptováno z Engelman *et al.*, 2006 a Backer, 2008.

3.2 Vps34p u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

Gen *VPS34* (2 628 bp) kóduje cytoplazmatický protein o délce 875 aminokyselinových zbytků (~100,9 kDa), který vazbou na Vps15p asociuje s membránami pozdního Golgiho aparátu, endozomů, vakuoly, PAS (z angl. *pre-autophagosomal structure*), peroxizomů a v oblasti spojení jádra a vakuoly (Herman a Emr, 1990; Stack et al., 1993; Obara et al., 2006; Grunau et al., 2011; Cherry et al., 2012; Gaur et al., 2013). *VPS34* byl nejprve popsán na základě narušení třídění vakuolárních proteinů, kdy mutace v tomto genu vedly k narušení cílení vakuolárních hydroláz (proteinázy A a B a karboxypeptidáza Y) do vakuoly (vps, angl. vacuolar protein sorting) (Robinson et al., 1988). C-koncová část Vps34p je z 33 % identická a z 55 % podobná katalytické podjednotce PI3K třídy I, což vedlo k názoru, že Vps34p by mohl být PI3K (Hiles et al., 1992). O rok později Schu a kolektiv prokázali, že Vps34p má skutečně PI3K aktivitu a zároveň je jediným enzymem katalyzujícím vznik PtdIns3p u kvasinky *S. cerevisiae* (Schu et al., 1993).



Obr. 3.3: Model Vps34p kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

A – model terciární struktury Vps34p vytvořený na základě homologního modelování pomocí programu I-TASSER upravený v programu PyMOL (podrobný popis viz kapitola 4.2.9). Tento model obsahuje 28 α helixů, 14 β struktur a neuspořádanou oblast na N-konci, která je způsobena nedostatkem vhodných templátů. B – v navrženém modelu jsou barevně vyznačeny jednotlivé domény Vps34p – doména C2 (zeleně), doména PIK (modře) a katalytická doména (oranžově). Doména C2 by měla být tvořena 2 β listy, který by každý obsahoval 4 β struktury (Huang et al., 2007), doména C2 mého modelu však obsahuje jen 6 β struktur uspořádaných do 2 β listů. Jeden z β listů však obsahuje ještě β strukturu z aminokyselinových zbytků mimo doménu C2 (aminokyselinové zbytky 203-207).

V rámci sekvence Vps34p můžeme rozlišit tři domény – doménu C2 (aminokyselinové zbytky 20-130, respektive 14-188), doménu PIK (294-535, respektive 293-526) a katalytickou (kinázovou) doménu (620-872, respektive 619-873), viz Obr. 3.2 a 3.3. Přesné rozsahy jednotlivých domén se mezi databázemi (SMART, respektive UniProt) mírně liší, zřejmě v závislosti na použitém predikčním algoritmu (Letunic et al., 2015; The UniProt Consortium, 2014).

Doména C2 je nejméně konzervovanou doménou PI3K, jejímž strukturním motivem u PI3K třídy I jsou 2 β listy složené ze 4 antiparalelních β struktur. Předpokládá se, že tato doména interaguje s membránovými fosfolipidy, přestože to zatím nebylo ověřeno *in vivo* (Huang *et al.*, 2007). Doména PIK (někdy také označována jako LKU, z angl. lipid kinase unique) je doména, kterou lze nalézt u všech PI3K a PI4K, avšak její funkce není známa. Na samotném C-konci je již zmíněná katalytická doména, která je zodpovědná za PI3K aktivitu (Letunic *et al.*, 2015). V současnosti jsou dostupné krystalové struktury lidského Vps34p a Vps34p z octomilky (*Drosophila melanogaster*). Struktura Vps34p kvasinky *S. cerevisiae* nebyla dosud určena.

3.2.1 Vps34p je PI3K i proteinkináza

Katalytická doména Vps34p vykazuje podobně jako katalytická doména PI3K třídy I PtdIns-3-kinázovou a proteinkinázovou aktivitu (Stack a Emr, 1994). Pro PI3K i proteinkinázovou aktivitu Vps34p jsou důležité konzervované aminokyselinové zbytky zodpovědné za vazbu ATP a za fosfotransferázovou aktivitu. Při záměně D731, N736 (klíčové aminokyselinové zbytky motivu DXHXXN katalytické smyčky) nebo D749 (část motivu DFG, který je typickým motivem proteinkináz) za jinou aminokyselinu, dojde ke snížení proteinkinázové aktivity Vps34p a k úplné ztrátě PI3K aktivity (Schu *et al.*, 1993; Stack a Emr, 1994). Konzervovanost těchto aminokyselinových zbytků u eukaryot svědčí o jejich esencialitě pro funkci Vps34p a jsou důkazem vhodnosti kvasinky *S. cerevisiae* jako modelu pro studium Vps34p (Obr. 3.4). Kromě těchto aminokyselinových zbytků v katalytické části kinázové domény je pro PI3K aktivitu klíčových 11 aminokyselinových zbytků na C-konci proteinu. Tato oblast Vps34p je dobře evolučně konzervována u všech eukaryot a je částečně konzervována i u PI3K třídy II. Zdá se, že by mohla být zodpovědná za specifitu těchto enzymů k PtdIns (Budovskaya *et al.*, 2002).

Stack a Emr prokázali, že Vps34p je schopný autofosforylace. *In vitro* využívá Vps34p pro autofosforylaci preferenčně Mn^{2+} ionty, případně Mg^{2+} ionty (s nimi je však fosforylační aktivita 10× nižší) a fosforylovány jsou threoninové, serinové i tyrosinové zbytky. Při *in vivo* podmínkách však pozorovali fosforylaci nejvíce na serinových zbytcích a méně na threoninových zbytcích (Stack a Emr, 1994). Pozdější studie určily jako místa fosforylace Vps34p *in vivo* Y114 a S117, případně Y658, jehož využití při fosforylaci je však nejisté. Tyto studie však neurčily, zda jsou nalezená fosforylační místa využívána pouze při autofosforylaci, nebo také jinými proteinkinázami (Bodenmiller *et al.*, 2008; Huber *et al.*, 2009).

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KSCAGYCVITYILGVGDRHLDNLLVTPDGHFFHADFGYILGQDPKP
<i>Candida albicans</i>	KSCAGYCVITYILGVGDRHLDNLLSPNGKFWHADFGYILGRDPKP
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	RSCAGYCVITYLLGVGDRHLDNLLITKDGHFFHADFGYILGRDPKL
<i>Arabidopsis thaliana</i>	KSCAGYSVITYILGIGDRHLDNLLLTDDGRLFHVDFAFILGRDPKP
<i>Xenopus laevis</i>	KSCAGYCVITYILGVGDRHLDNLLLTGKLFHIDFGYILGRDPKP
<i>Homo sapiens</i>	KSCAGYCVITYILGVGDRHLDNLLLTGKLFHIDFGYILGRDPKP
	:*****.*****:***:*****:***:*****:***:*****:***

Obr. 3.4: Evoluční konzervovanost katalytického jádra kinázové domény Vps34p

Katalytická část kinázové domény proteinu Vps34p (aminokyselinové zbytky 715-760, podle Vps34p *S. cerevisiae*) je u eukaryot dobře evolučně konzervována (sekvenční identita tohoto úseku je u srovnávaných organismů 65 %). Sekvence DRHLDN, která představuje oblast katalytické smyčky Vps34p je identická u všech srovnávaných organismů, avšak klasický motiv proteinkináz – DFG je u *Arabidopsis thaliana* nahrazen motivem DFA. Aminokyselinové zbytky, jejichž záměna u *S. cerevisiae* vede k narušení proteinkinázové aktivity a ztrátě PI3K aktivity jsou konzervovány u všech organismů, což potvrzuje jejich klíčovou roli v rámci kinázové domény (vyznačeno žlutě). Hvězdička označuje pozici se 100% identitou, dvojtečka pozici s vysokou podobností u všech proteinů a tečka pozici s méně synonymní záměnou. Vytvořeno v programu Clustal W2 (Larkin *et al.*, 2007). Přístupové kódy sekvencí v GenBank: P22543, Q92213, P50520, P42339, Q6AZN6 a Q8NEB9.

Autofosforylační aktivita Vps34p je negativně ovlivňována inhibitory PI3K aktivity wortmanninem a LY294002, což naznačuje, že obě aktivity zajišťuje stejná katalytická doména. Význam autofosforylace Vps34p je však nejasný, protože fosforylovaný i nefosforylovaný Vps34p mají *in vitro* stejnou PI3K aktivitu (Stack a Emr, 1994).

Kromě autofosforylace fosforyluje Vps34p také některé buněčné proteiny: Qdr2p (fosforylován na T38 a S40), Sec7p (S780 a S782), Yor022cp (S243, T244, S245), Zap1p (S151) a Zeo1p (T49) (Bodenmiller *et al.*, 2010), viz Tab. 3.1.

Tab. 3.1: Proteiny fosforylované Vps34p

Protein	Funkce	Lokalizace
Qdr2p	Transmembránový přenašeč kationtů a léčiv, výměnou transportuje H ⁺ .	cytoplazmatická membrána
Sec7p	Stimulátor výměny GDP za GTP zapojený do transportu proteinů, proliferace Golgiho aparátu, autofágie a do transportu v rámci Golgiho aparátu a mezi endoplazmatickým retikulem a Golgiho aparátem.	cytoplazma Golgiho aparát (trans a vácýk) pozdní endozomy
Yor022cp	Předpokládaný enzym s fosfolipázovou aktivitou štěpící kyselinu fosfatidovou.	mitochondrie
Zap1p	Transkripční faktor regulující transkripci genů v závislosti na dostupnosti zinku.	jádro
Zeo1p	Periferní protein zapojený do uspořádávání buněčné stěny a regulace dráhy buněčné integrity. Ve fosforylovaném stavu se nachází v mitochondriální buněčné frakci.	cytoplazmatická membrána mitochondrie

Anotace jsou převzaty ze *Saccharomyces* Genome Database (SGD, <http://www.yeastgenome.org/>, Cherry *et al.*, 2012) a UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>, The UniProt Consortium, 2014), aktuální k 1. 5. 2015.

3.2.2 Vps15p – regulační podjednotka Vps34p

Stejně jako *VPS34* byl i *VPS15* nejprve popsán jako gen, jehož mutace vede k narušení třídění vakuolárních hydroláz do vakuoly (Robinson *et al.*, 1988). Gen *VPS15* (4365 bp) kóduje cytoplazmatickou serin/threonin proteinkinázu (1464 aminokyselinových zbytků, ~166,4 kDa).

Iniciační methionin je posttranslačně odstraněn a N-koncový glycin je myristoylován. Přestože je myristoylace důležitá pro aktivitu Vps15p, není nezbytná pro jeho správnou lokalizaci na membrány pozdního Golgiho aparátu a endozomů (*Herman et al., 1991*). V rámci Vps15p můžeme nalézt 3 základní domény – kinázovou doménu (27-300), čtyři helikální domény, tzv. HEAT repetice (460-497, 576-613, 615-652 a 654-691) a šest úseků repetice tryptofanu a kyseliny asparagové, tzv. WD-40 (1078-1118, 1126-1165, 1229-1268, 1275-1315, 1344-1382 a 1422-1453) – viz Obr. 3.2 (*The UniProt Consortium, 2014*).

Bodové mutace *VPS15* v oblasti kódující kinázovou doménu, které vedou ke změně konzervovaných sekvenčních motivů typických pro proteinkinázy, obvykle inaktivují Vps15p, což způsobí narušení třídění vakuolárních proteinů a ztrátu fosforylace Vps15p *in vivo*. Zajímavé je, že delece vedoucí ke ztrátě 214 aminokyselinových zbytků z C-konce Vps15p, způsobuje vážný pokles fosforylace tohoto proteinu *in vivo*, ale jen k mírné narušení třídění vakuolárních proteinů. Obdobný efekt má i delece genu kódující 30 aminokyselinových zbytků z C-konce Vps15p. Vnitřní delece 16 aminokyselinových zbytků (1412-1427) však nemá na fosforylaci Vps15p vliv (*Herman et al., 1991*). Stack a Emr prokázali, že Vps15p je *in vivo* fosforylován preferenčně na serinových zbytcích a pouze minimálně na threoninových zbytcích. Rovněž potvrdili, že Vps15p je schopen autofosforylace *in vitro* (*Stack a Emr, 1994*). Objevil se však i názor, že fosforylace Vps15p *in vitro* mohla být způsobena koimunoprecipitací zatím neznámé proteinkinázy spolu s Vps15p (*Backer, 2008*). Jisté je pouze to, že *in vivo* jsou u Vps15p fosforylovány serinové zbytky S904 a S1385 v oblastech blízko WD repetice. Konkrétní proteinkinázy (pokud to není výsledek autofosforylace) nejsou známy, ale předpokládá se, že S1385 je fosforylován Cdc28p (*Albuquerque et al., 2008; Helbig et al., 2010*).

Vps15p je kromě autofosforylace schopen fosforylovat i jiné buněčné proteiny. Jeho proteinkinázová aktivita byla potvrzena u Par32p (neesenciální cytoplazmatický protein neznámé funkce) a Yar009cp (transpozonový protein analogický proteinům Gag a Pol u retrovirů) (*Bodenmiller et al., 2010; Cherry et al., 2012*).

Delece *VPS15* nebo *VPS34* vede ke stejnému fenotypu (problémy při transportu vakuolárních hydroláz a neživotaschopnost buněk při 37 °C) (*Robinson et al., 1988*). Současná delece obou genů však nevykazuje žádný další fenotyp. Při deleci *VPS15* vykazuje Vps34p pouze nízkou bazální aktivitu PI3K a rovněž dochází ke změně lokalizace Vps34p z membrán volně do cytosolu. Pro plnou aktivaci PI3K aktivity Vps34p je tedy nezbytný Vps15p (*Stack et al., 1993*).

Existují 2 možné modely, jak Vps15p reguluje aktivitu Vps34p – pomocí fosforylace, nebo navedením Vps34p na membránu. Bez této pozitivní regulace by Vps34p vykazoval jen

bazální aktivitu PI3K. Alternativou těchto modelů je, že Vps15p není zodpovědný za indukci PI3K aktivity Vps34p, ale pouze za jeho přesné zacílení na konkrétní oblast membrány (Backer, 2008).

Vps34p interaguje s proteinkinázou Vps15p a tvoří v buňkách membránově vázané komplexy (Stack *et al.*, 1993; Kihara *et al.*, 2001). Tato skutečnost, spolu se zjištěním, že funkční proteinkinázová doména Vps15p je nezbytná pro plnou aktivaci PI3K aktivity Vps34p, vedla k přesvědčení, že Vps15p fosforyluje Vps34p (Stack *et al.*, 1993). Stack a Emr však prokázali, že k fosforylaci Vps34p dochází i v buňkách s delecí *VPS15* a je způsobena autofosforylací (Stack a Emr, 1994). Bodové mutace *VPS15* v oblasti kódující kinázovou doménu Vps15p mají stejný fenotyp jako delece *VPS15*, přestože PI3K aktivita je snížena méně než při deleci *VPS15*. Vliv těchto bodových mutací může být překonán zvýšenou expresí *VPS34*. Zvýšená exprese *VPS34* však nezvrátí fenotyp v případě použití kombinace více bodových mutací v kinázové doméně Vps15p nebo při deleci *VPS15* (Stack *et al.*, 1993). Zvýšená exprese *VPS34* u kmene s bodovou mutací v kinázové doméně Vps15p způsobí dvojnásobný nárůst PtdIns3P v porovnání se zvýšenou expresí *VPS34* v buňkách s delecí *VPS15*. Je možné, že pro potlačení fenotypu delece *VPS15* není množství PtdIns3P dostatečné, případně není tento PtdIns3P správně lokalizován (Stack *et al.*, 1995).

Funkční kinázová doména Vps15p je nezbytná pro asociaci a aktivaci Vps34p – ne však jako vazebné místo, ale pro svoji katalytickou aktivitu. Bodové mutace v kinázové doméně Vps15p potlačují interakce s Vps34p. Zdá se, že autofosforylace Vps15p umožňuje vazbu Vps34p (Stack *et al.*, 1995).

Zatímco mutace v kinázové doméně Vps15p brání vazbě Vps34p, mutace v kinázové doméně Vps34p nemají na vazbu Vps15p vliv. Kromě kinázové domény Vps15p jsou pro vazbu Vps34p nezbytné HEAT repetice. Nezbytná je nejméně jedna HEAT repetice, vyšší počet těchto repetit však zvyšuje účinnost interakce. Pro vazbu Vps15p je klíčových 28 aminokyselinových zbytků (837-864) Vps34p. C-koncová část Vps34p je konzervována u všech organismů, ne však u PI3K třídy I a II, což zřejmě souvisí s její funkcí jako interakční domény pro Vps15p (Budovskaya *et al.*, 2002).

PtdIns3P je u *S. cerevisiae* lokalizován na membránách endozomů a vakuol. Pokud dojde k narušení membránového transportu mezi endozomy a vakuolou, většina PtdIns3P je akumulována na endozomech (Gillooly *et al.*, 2001). Při inaktivaci Vps34p (použitím termosenzitivní mutanty) dojde po 10 minutách ke snížení množství PtdIns3P o více než 50 %. Po jedné hodině klesne množství PtdIns3P přibližně na 15 % počáteční koncentrace (Stack *et al.*, 1995). To svědčí o nutnosti neustálé aktivity Vps34p. Zajímavé rovněž je, že oproti savcím

buňkách je koncentrace PtdIns3P u kvasinek stejná jako koncentrace PtdIns4P (*Auger et al., 1989*).

3.2.3 Proteiny interagující s PtdIns3P

Fosforylace fosfatidylinositolu je považována za hlavní způsob signalizace Vps34p, protože vede k lokalizaci proteinů s vazebnou doménou pro PtdIns3P na příslušnou membránu či přímo ovlivňuje funkce daného proteinu, například indukcí změny jeho konformace (*Burd a Emr, 1998; Backer, 2008*). Jsou známy 2 typy vazebných domén, které jsou specifické pro PtdIns3P – doména FYVE a doména PX (*Burd a Emr, 1998; Yu a Lemmon, 2001*).

Doména FYVE je pojmenována prvními písmeny proteinů, u kterých byla popsána – Fab1p, YOTB, Vac1p a EEA1 a jejím typickým rysem jsou zinkové prsty (angl. Zinc-fingers) s evolučně konzervovaným sekvenčním motivem (R/K)(R/K)HHCR a celkem osmi cysteinovými zbytky, které váží dva atomy Zn^{2+} (*Stenmark et al., 1996; Burd a Emr, 1998; Misra a Hurley, 1999*). Doménu FYVE je možné najít u hub, rostlin i savců – včetně člověka, a v současné době (9. 8. 2015) je známo 7 144 proteinů s touto doménou (podle databáze SMART) (*Gaullier et al., 1998; Letunic et al., 2015*). U *S. cerevisiae* je celkem 5 proteinů, které mají doménu FYVE: Fab1p, Pib1p, Pib2, Vac1p a Vps27p (*Burd a Emr, 1998*) (viz Tab. 3.2).

Zinkové prsty domény FYVE jsou nezbytné pro specifickou vazbu PtdIns3P. Pokud jsou ionty Zn^{2+} odstraněny chelatačním činidlem (např. pomocí EDTA) nebo je do sekvence genu kódujícího protein s doménou FYVE zavedena bodová mutace vedoucí k záměně některého z konzervovaných aminokyselinových zbytků, nedochází k vazbě PtdIns3P. Rovněž dojde k nesprávné lokalizaci proteinu s doménou FYVE – namísto membrán endozomů je protein volně v cytoplazmě, jako je tomu v případě Pib1p a EEA1 (*Stenmark et al., 1996; Burd a Emr, 1998; Gaullier et al., 1998*). Pro správnou (membránovou) lokalizaci proteinu s doménou FYVE je však nezbytná nejen doména FYVE, ale také aminokyselinové zbytky v její blízkosti (*Stenmark et al., 1996; Burd a Emr, 1998*).

Neplatí to však pro všechny proteiny s doménou FYVE. U Vac1p a savčího proteinu Hrs (homolog Vps27p) je vazba na membrány endozomů nezávislá na doméně FYVE či na koncentraci PtdIns3P v buňce (*Burd et al., 1997; Komada et al., 1997*). Vazba PtdIns3P ovlivňuje funkci těchto proteinů nikoliv lokalizací, ale změnou konformace nebo navedením proteinu s doménou FYVE do mikrodomény endozomální membrány bohaté na PtdIns3P, kde mohou být další interakční partneři (*Burd a Emr, 1998; Gaullier et al., 1999*).

Druhým typem vazebné domény specifické pro PtdIns3P je doména PX (z angl. Phox homology). Tato doména byla poprvé popsána u proteinů p40(phox) a p47(phox), které jsou

součástí komplexu NADPH oxidázy fagocytů (angl. phagocyte NADPH oxidase, phox) (Ponting, 1996). Také tato doména je evolučně konzervována u všech eukaryot a v současné době (9. 8. 2015) je známo 10 427 proteinů obsahujících tuto doménu (podle databáze SMART) (Letunic et al., 2015).

Přestože doména PX byla zpočátku popsána na základě společného sekvenčního motivu, v rámci jednotlivých domén PX je jen málo evolučně konzervovaných pozic. Oproti tomu struktura domén PX evolučně konzervována je (Ponting, 1996; Vollert a Uetz, 2004). Charakteristickým rysem je kladně nabitá kapsa, která váže PtdIns3P pomocí bazických aminokyselinových zbytků lysinu a argininu (Bravo et al., 2001; Hiroaki et al., 2001).

U *S. cerevisiae* je celkem 15 proteinů s doménou PX (viz Tab. 3.2), které preferují PtdIns3P před ostatními fosfoinositidy. Výjimkou je Ypr097wp, který stejně ochotně váže také PtdIns4P, PtdIns5P, PtdIns(3,4)P₂ a PtdIns(4,5)P₂. Preference (nebo také specifita) PtdIns3P se zdá být nezávislá na afinitě daného proteinu k PtdIns3P, protože proteiny s nejvyšší afinitou k PtdIns3P (Mdm1p, Grd19p, Vam7p a Yhr105wp) rozpoznávají a váží i jiné fosfoinositidy (Vam7p například PtdIns5P). Oproti tomu některé proteiny s nižší afinitou k PtdIns3P (Spo14p, Vps5p a Ykr078wp) rozpoznávají a váží specificky pouze PtdIns3P. Pouze Mdm1p, Snx3p, Vam7p a Ypt35p jsou však schopné navést protein s doménou PX na membránu endozomu jen na základě afinity k PtdIns3P. U zbylých proteinů s doménou PX se na jejich lokalizaci zřejmě podílí další domény téhož proteinu, případně tvorba homo či heterooligomerů a doména PX poskytuje specifitu ke konkrétní membráně (Yu a Lemmon, 2001).

Tab. 3.2: Proteiny s vazebnou doménou pro PtdIns3P u *S. cerevisiae*

Protein	Funkce	Lokalizace	Doména
Atg18p	Klíčový protein pro morfologii vakuoly a pro tvorbu váčků při autofágii. Rovněž je zapojen do pexofágie a cílení váčků do vakuoly. Mohl by hrát roli při replikaci DNA, a také jako negativní regulátor aktivity Fab1p. Paralog Atg21p.	cytoplazma endozomy vakuola PAS	?
Atg20p	Protein zapojený do mitofágie, pexofágie a autofágie a do endozomálního transportu. Hraje významnou roli v buněčné odpovědi na stres ER. Interaguje se Snx4p.	endozomy PAS	PX
Atg21p	Protein nezbytný pro autofágii a mitofágii. Paralog Atg18p.	cytoplazma endozomy vakuola	?
Atg27p	Transmembránový protein zapojený do tvorby váčku, pexofágie a autofágie.	mitochondrie Golgiho aparát PAS	?
Bem1p	Protein nezbytný pro určení buněčné polarizace, tvoří proteinové lešení pro další proteiny včetně cytoskeletu.	cytoplazma mitochondrie	PX
Bem3p	Protein regulující organizaci cytoskeletu a udržování buněčné polarizace. Negativní regulátor odpovědi na feromon.	cytoplazma	PX

Fab1p	Jediná fosfatidylinositol-3-fosfát-5-kináza u <i>S. cerevisiae</i> , fosforylující PtdIns3P za vzniku fosfatidylinositol(3,5)difosfátu. Hraje roli v membránovém transportu, homeostázi vakuoly a v buněčné odpovědi na osmotické změny.	endozomy mitochondrie vakuola PAS	FYVE
Hsv2p	Protein zapojený do nukleofágie.	cytoplazma endozomy vakuola	?
Mdm1p	Klíčový protein pro rozdělení organel (jádra a mitochondrií) mezi mateřskou a dceřinou buňkou .	cytoplazma	PX
Mvp1p	Spolu s Vps1p je nezbytný pro správné cílení proteinů do vakuoly. Hraje roli při regulaci transkripce některých genů interakcí s RNA polymerázou II.	cytoplazma jádro	PX
Pep7p	Adaptorový protein, který hraje roli při cílení proteinů do vakuoly. Rovněž je zapojen do dělení vakuoly mezi mateřskou a dceřinou buňkou.	cytoplazma endozomy jádro	FYVE
Pib1p	Protein E3 ubikvitinligáza.	endozomy vakuola	FYVE
Pib2p	Protein s neznámou funkcí.	mitochondrie	FYVE
Spo14p	Fosfolipáza D, hraje roli při meióze, tvorbě spór, sekreci a regulaci transkripce některých genů interakcí s RNA polymerázou II.	endozomy jádro membrána prospór	PX
Snx3p	Protein nezbytný pro recyklaci proteinů pozdního Golgiho aparátu zpět z endozomů.	cytoplazma endozomy Golgiho aparát	PX
Snx4p	Protein zapojený do recyklace proteinů pozdního Golgiho aparátu zpět z endozomů, dělení vakuol, do autofágie, mitofágie a pexofágie. Interaguje s Atg20p a Snx41p.	cytoplazma endozomy PAS	PX
Snx41p	Protein zapojený do recyklace proteinů pozdního Golgiho aparátu zpět z endozomů. Interaguje se Snx4p.	endozomy	PX
Vam7p	Protein zapojený do cílení proteinů do vakuoly a do nukleofágie. Hraje klíčovou roli při morfogenezi vakuol.	vakuola	PX
Vps5p	Protein zapojený do recyklace membránových proteinů pozdního Golgiho aparátu zpět z endozomů. Interaguje s Vps17p při tvorbě váčků. Paralog Ykr078wp.	cytoplazma endozomy Golgiho aparát	PX
Vps17p	Protein zapojený do recyklace membránových proteinů pozdního Golgiho aparátu zpět z endozomů. Interaguje s Vps5p při tvorbě váčků.	endozomy	PX
Vps27p	Protein s vazebným motivem pro ubikvitin zapojený do cílení ubikvitinylovaných proteinů k degradaci a do recyklace proteinů Golgiho aparátu.	endozomy	FYVE
Ypt35p	Protein s neznámou funkcí.	endozomy	PX
Ykr078wp	Protein s neznámou funkcí. Paralog Vps5p.	cytoplazma	PX
Ypr097wp	Protein s neznámou funkcí.	mitochondrie	PX

Anotace jsou převzaty ze *Saccharomyces* Genome Database (SGD, <http://www.yeastgenome.org/>, Cherry et al., 2012) a UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>, The UniProt Consortium, 2014), aktuální k 1. 5. 2015.

Sekvenční motiv PXXP v doménách PX u proteinů p40(phox) a p47(phox), který je typickým vazebným motivem SH3 (Src homology 3) domén, vedl Pontinga k názoru, že doména PX může být interakčním partnerem domén SH3 (Ponting, 1996). Vollert a Uetz (2004) provedli

celogenomovou studii všech známých proteinů s doménou PX *S. cerevisiae* v kvasinkovém dvouhybridovém systému. Vedle celých proteinů s doménou PX takto otestovali také samotné domény PX jednotlivých proteinů. Pro proteiny Bem3p, Mdm1p, Spo14p, Ykr078wp a Ypr097wp nenalezli žádné interakční partnery. Protein Snx41p nemohl být testován, kvůli jeho vlastní transkripční aktivitě v dvouhybridovém systému. Bem1p, Snx4p a Vps5p interagují s jinými proteiny jediné jako kompletní proteiny, ne v případě samotných domén PX. Z toho plyne, že jejich domény PX nejsou zodpovědné za interakce s jinými proteiny. Podobně je tomu u Snx3p a Ypt35p, které jsou však téměř celé tvořeny doménou PX. Doména PX z Mvp1p (ne však kompletní Mvp1p) interaguje s jadernými proteiny zapojenými do transkripce RNA polymerázou II a do exportu mRNA. Atg20p, Vam7p a Vps17p mají různé interakční partnery, které se často liší, pokud je použit celý protein či jen samotná doména PX. Většinu interakčních partnerů proteinů s PX doménami tvoří proteiny zapojené do transportu váčků (často jde o proteiny z rodiny Yip1), které jsou lokalizovány v rámci sekreční nebo endocytické dráhy (endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, endozomy a vakuola). V případě Atg20p, Snx4p a Mvp1p jsou jejich interakčními partnery často jaderné proteiny. Zajímavé je, že tyto protein-proteinové interakce jsou zřejmě nezávislé na vazbě PtdIns3P (Vollert a Uetz, 2004).

Nejen proteiny s doménami FYVE a PX jsou schopné rozpoznávat PtdIns3P a vázat se na něj. První popsáný protein s touto funkcí byl Atg27p. Atg27p se *in vitro* váže na PtdIns3P a s 3-6× nižší afinitou také na PtdIns4P, PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(4,5)P₂. Za interakci s PtdIns3P by měl být zodpovědný bazický motiv KKPAKK, neboť při nahrazení lysinu za alanin nedochází k vazbě PtdIns3P *in vitro* (Wurmser a Emr, 2002). V roce 2007 však Yen a kolektiv zjistili, že sekvence ATG27 obsahovala chybu vzniklou při sekvenování a skutečná sekvence Atg27p je na N-konci delší o 75 aminokyselinových zbytků. Tím se však změnila topologie tohoto transmembránového proteinu z typu II na typ I a bazický motiv rozpoznávající PtdIns3P je orientován do lumen, nikoli do cytoplazmy, kde je PtdIns3P. Rovněž prokázali, že PtdIns3P není nezbytný pro cílení Atg27p na konkrétní membránu, ani pro jeho funkci (Yen et al., 2007). Zda Atg27p skutečně interaguje s PtdIns3p *in vivo* a případně za jakých podmínek, je stále nejasné.

Dalšími proteiny bez domény FYVE či PX, které rozpoznávají a jsou schopné se vázat na PtdIns3P, jsou Atg18p, Atg21p a Hsv2p (viz Tab. 3.2). Tyto proteiny se *in vitro* váží na PtdIns3P a PtdIns4P a s výrazně nižší afinitou také na PtdIns5P a PtdIns(3,5)P₂. V buňkách jsou lokalizovány na membránách endozomů, vakuol a PAS, avšak v buňkách s delecí *VPS15* nebo *VPS34* jsou tyto proteiny volně v cytoplazmě, což nasvědčuje, že pro své cílení na membránu vyžadují PI3K aktivitu a PtdIns3P, případně PtdIns(3,5)P₂. Za vazbu fosfoinositidů jsou u těchto

proteinů zřejmě zodpovědné aminokyselinové zbytky na N-koncích a v centrální části proteinů, protože jejich odstranění vede ke ztrátě schopnosti fosfoinositidy vázat (*Strømhaug et al., 2004*).

Přestože je většina PtdIns3P u *S. cerevisiae* na membránách endozomů a vakuol (*Gillooly et al., 2001*), některé proteiny s vazebnou doménou pro PtdIns3P jsou lokalizovány (také) jinde. V případě Atg27p, Fab1p, Bem1p, Pib2p či Ypr097wp jsou to mitochondrie, u Mvp1p, Pep7p a Spo14p jádro. Je pravděpodobné, že za tuto jejich lokalizaci je zodpovědná interakce s dalšími (membránovými) proteiny či lipidy než jen s PtdIns3P (*Yu a Lemmon, 2001*).

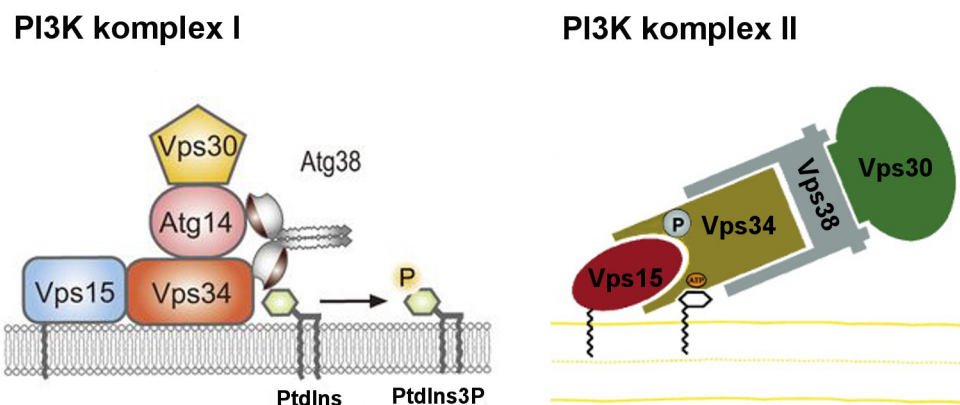
3.2.4 Buněčné procesy spojené s Vps15p a Vps34p

V kvasinkové buňce v exponenciální fázi růstu kultivované submerzně v komplexním médiu (YEPD) při 30 °C je přibližně 280 molekul Vps15p a 1080 molekul Vps34p (*Ghaemmaghami et al., 2003*). Přestože koncentrace Vps34p je více než 3× vyšší než koncentrace Vps15p, na membránách je jejich poměr 1:1. K výrazné změně tohoto poměru nedojde ani při zvýšené expresi Vps34p, což svědčí o tom, že Vps15p je na membránách hlavním interakčním partnerem Vps34p (*Stack et al., 1993*). Oba tyto proteiny ochotně vytvářejí komplexy s jinými proteiny. V případě Vps15p bylo popsáno 50 interakčních partnerů, u Vps34p 72 interagujících proteinů, včetně homointerakcí u obou proteinů (databáze BioGRID 3.4, 7. 7. 2015) (*Chatr-Aryamontri et al., 2013*).

Prvními objevenými a zároveň nejlépe prozkoumanými jsou s membránou asociované PI3K komplexy I a II (Obr. 3.5). Komplex I je tvořen Vps15p, Vps34p, Atg14p, Vps30p a homodimerem Atg38p, který je nezbytný pro stabilizaci celého komplexu. Bez Atg38p je schopnost ostatních proteinů tvořit tento komplex snížena o ~75% (*Kihara et al., 2001; Araki et al., 2013*). Tento komplex hraje roli v regulaci makroautofágie, Cvt dráhy (angl. Cytoplasm-to-vacuole) (*Kihara et al., 2001*), autofágii peroxizomů (pexofágii) (*Grunau et al., 2011*) a mikroautofágii cytosolických lipidových kapek (*van Zutphen et al., 2014*). PI3K komplex I je lokalizován na membráně vakuoly a v oblasti PAS, kam je naveden pomocí Atg14p a možná i Vps15p (*Obara et al., 2006*). Část komplexů I je asociována s membránou peroxizomů. Produkovaný PtdIns3P je rozpoznáván proteiny s doménou PX (Atg18p, Atg20p, Atg27p, Snx4p a Vam7p), které jsou zapojeny do pexofágie (*Grunau et al., 2011*).

Komplex II je v buňkách významně četnější než komplex I a je tvořen Vps15p, Vps34p, Vps38p a Vps30p. Delece *VPS30* nebo *VPS38* snižuje aktivitu PI3K o ~20 %, tvorba komplexu má tedy mírný pozitivní vliv na aktivitu Vps34p. Funkcí komplexu II je regulace transportu vakuolárních hydroláz (např. karboxypeptidázy Y) z Golgiho aparátu do vakuoly (*Kihara et al., 2001*). Rovněž je zodpovědný za lokalizaci proteinů s doménou FYVE (Atg18p, Ag21p a Hsv2p)

na membrány endozomů. Jaké funkce zde tyto proteiny plní, není známo, protože delece genů *ATG18*, *ATG21* ani *HSV2* neovlivňují transport vakuolárních proteinů. Hsv2p však hraje roli v mikroautofágii buněčného jádra (nukleofágii) (Krick *et al.*, 2008). Komplex II je lokalizován na membránách endozomů a na membráně vakuoly (Obara *et al.*, 2006).



Obr. 3.5: Fosfatidylinositol-3-kinázové komplexy I a II u *Saccharomyces cerevisiae*

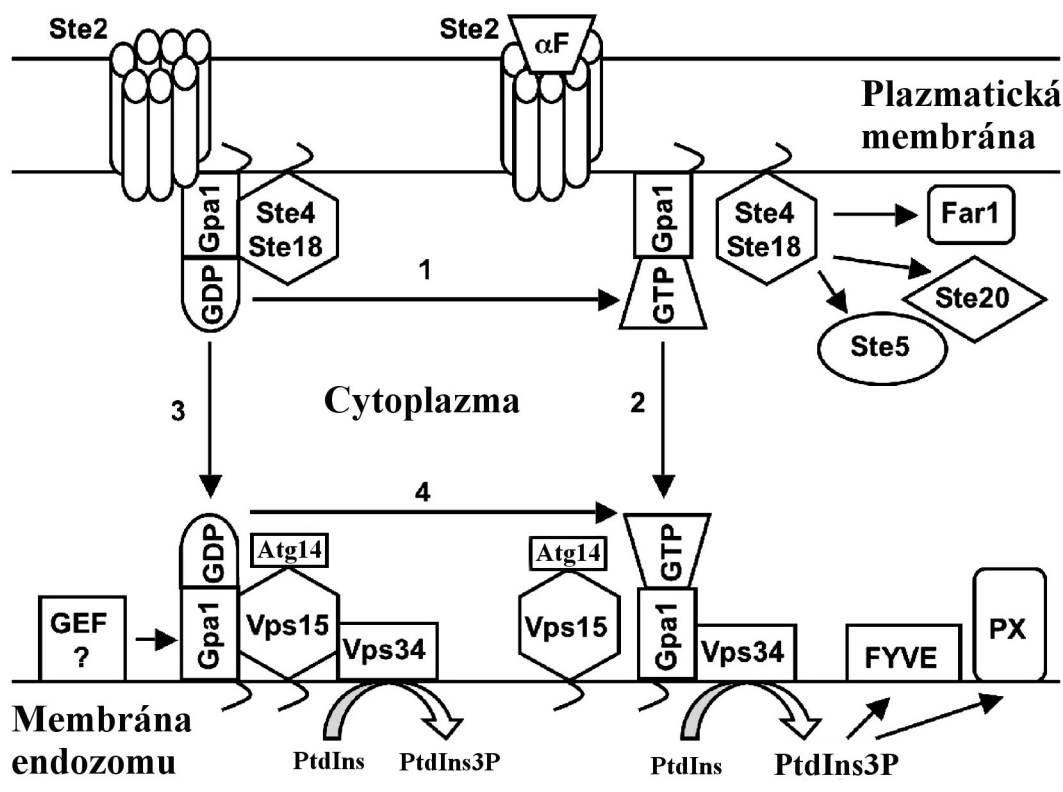
Schéma složení a organizace podjednotek PI3K komplexů I a II. Za asociaci s membránou je u obou komplexů zodpovědný Vps15p, který váže Vps34p a zvyšuje jeho PI3K aktivitu. U komplexu I Vps34p váže Atg14p a na něj se váže Vps30p. Celý komplex je stabilizován dimerem Atg38p. V případě komplexu II se na Vps34p váže Vps38p a s ním interaguje Vps30p. Spíše než na regulaci aktivity Vps15p a Vps34p se tyto komplexy podílejí na jejich správné lokalizaci na konkrétní membránu. Adaptováno ze Strahl a Thorner, 2007 a Araki *et al.*, 2013.

Delece *VPS15* nebo *VPS34* vede k narušení transportu proteinázy A a proteinázy B z Golgiho aparátu do vakuoly a k neživotaschopnosti při 37 °C (Robinson *et al.*, 1988). Kmeny s delecí *ATG14*, *VPS30* nebo *VPS38* tyto fenotypy nevykazují. Musí tedy existovat i další PI3K komplexy, které regulují transport vakuolárních proteinů (jiných než karboxypeptidázy Y) a ovlivňují životaschopnost buněk (Kihara *et al.*, 2001).

Vps34p je rovněž zapojen do autofágie endoplazmatického retikula (tzv. ER-fágie), přesné složení případného PI3K komplexu však není známo (van Zutphen *et al.*, 2014).

Překvapivým zjištěním bylo, že PI3K aktivita Vps34p je pozitivně regulována při párování. Vps15p se spolu s Vps34p podílejí na buněčné odpovědi na feromon – aktivují transkripci genů regulovaných feromonem, aktivují MAPK dráhu (proteinkinázová dráha aktivovaná mitogenem), zastavují růst a pozitivně regulují párování. Přítomnost α faktoru (feromon) je rozpoznána receptorem spřaženým s trimerními G proteiny a aktivovaná α podjednotka Gpa1p (s navázaným GTP) je transportována z cytoplazmatické membrány na membránu endozomu, kde se váže na Vps34p a stimuluje jeho PI3K aktivitu (Obr. 3.6). Gpa1p s navázaným GDP je rovněž transportován na membránu endozomů a váže se na Vps15p (v oblasti WD-40), který slouží jako β podjednotka trimerního G proteinu. Gpa1p s navázaným

GDP však neovlivňuje aktivitu Vps34p. Součástí tohoto PI3K komplexu, který je odlišný od dříve popsaných PI3K komplexů, je i Atg14p, který slouží jako γ podjednotka trimerního G proteinu a váže se na Vps15p (Slessareva *et al.*, 2006; Heenan *et al.*, 2009). Vps34p je rovněž nezbytný pro sekreci aktivního α faktoru (Banuelos *et al.*, 2010).



Obr. 3.6: Aktivace Vps34p v odpovědi na feromon

Feromon (α faktor) aktivuje receptor Ste2p, čímž dojde k aktivaci trimerního G proteinu (šipka 1). GDP vázaný Gpa1p (α podjednotka) je vyměněn za GTP a Ste4p a Ste18p (β a γ podjednotky) aktivují efektorové proteiny (Far1p, Ste5p a Ste20p). Gpa1p může měnit svoji lokalizaci z cytoplazmatické membrány na membránu endozomu (šipky 2 a 3). Gpa1p s GDP interaguje s Vps15p, který váže Atg14p (slouží jako β a γ podjednotky). Po výměně GDP za GTP katalyzované neznámým proteinem (GEF) se Gpa1p uvolní z Vps15p, naváže se na Vps34p a stimuluje jeho PI3K aktivitu (šipky 2 a 4). Vzniklý PtdIns3P je poté rozpoznáván proteiny s vazebnou doménou pro PtdIns3P (FYVE a PX). Adaptováno ze Slessareva *et al.*, 2006.

Vps15p a Vps34p hrají významnou roli při skládání vakuolárních protonových pump (V-ATPáz), a tím i při tvorbě protonového gradientu na vakuolární membráně. Při delecí *VPS15* nebo *VPS34* nejsou V-ATPázy ve vakuole, ale difuzně v cytoplazmě. Aktivita V-ATPáz lokalizovaných ve vakuole v buňkách s delecí *VPS34* je snížena o 60-80 % (Raymond *et al.*, 1992). Protonový gradient na vakuolární membráně je nezbytný pro správnou funkci vakuoly. Bez něj je narušena homeostáza vápníku, buňky nejsou schopné využít nefermentovatelné zdroje uhlíku (např. glycerol), je výrazně snížena odolnost vůči léčivům a narušena recyklace proteinů cytoplazmatické membrány (včetně senzoru stresu v buněčné stěně – Wsc1p) (Ohya *et al.*, 1991;

Yoshida a Anraku, 2000; Ueno et al., 2014). Narušení skládání V-ATPáz u buněk s delecí *VPS15* a *VPS34* je vysvětlením, proč u nich byly popsány stejné fenotypy, které jsou spojeny se ztrátou protonového gradientu na vakuolární membráně.

Řada proteinů kódovaných *VPS* geny (včetně *VPS15* a *VPS34*) pozitivně ovlivňuje délku telomer. Delece *VPS15* nebo *VPS34* vede ke zkrácení telomer. Současná delece *VPS15*, nebo *VPS34* a genu pro telomerázu, nebo *YKU70* (kóduje podjednotku heterodimeru Ku) nemá kumulativní vliv na délku telomer. Vps proteiny tedy zřejmě ovlivňují aktivitu telomerázy a heterodimeru Ku, přestože přesný mechanismus není znám (*Rog et al., 2005*).

Nedávný výzkum ukázal, že Vps15p a Vps34p (a některé další Vps proteiny) pozitivně regulují elongační fázi transkripce RNA polymerázou II. Imunoprecipitace chromatinu prokázala, že oba proteiny interagují s chromatinem v oblasti kódujících sekvencí genů, jejichž exprese je indukována transkripčními faktory Gal4p nebo Gcn4p, ale i genů, které jsou exprimovány konstitutivně. Jejich asociace s chromatinem je stimulována fosforylací C-terminální domény RNA polymerázy II proteinem Kin28p. Kromě toho ovlivňují také lokalizaci aktivně exprimovaných genů (testováno u *GAL1* a *INO1*) na periferii jádra. Vps15p a Vps34p jsou v tomto případě lokalizovány v jaderných pórech v oblasti spojení jádra a vakuoly, Vps15p byl zaznamenán i uvnitř jádra (*Gaur et al., 2013*).

Celogenomová analýza delečních kmenů kultivovaných s PI3K inhibitorem wortmanninem prokázala, že existují spojení mezi metabolismem fosfatidylinositolu a proteosyntézou, proteazomální degradací proteinů, modifikacemi chromatinu, regulací transkripce, vnitrobuněčným transportem, cytoskeletem, udržováním buněčné stěny, replikací a reparací DNA (*Zewail et al., 2003*). Do kterých procesů jsou zapojeny Vps15p a Vps34p, však autoři nezkoumali.

Metabolismus fosfoinositidů hraje významnou roli v regulaci MAPK dráhy spojené s filamentárním růstem (*Adhikari a Cullen, 2015*). Buňky s delecí *VPS34* mají výrazně sníženou schopnost invazivního růstu a stejně jako u buněk s delecí *VPS15* kolonie netvoří strukturované biofilmy (*Sarode et al., 2011*). Delece genu *FAB1* (kóduje PtdIns3P-5-kinázu) (*Gary et al., 1998*) vede rovněž k narušení filamentárního růstu (*Adhikari a Cullen, 2015*).

Neméně podstatná je PI3K aktivita Vps34p jako zdroj substrátu (PtdIns3P) pro jedinou PtdIns3P-5-kinázu – Fab1p. Fab1p je nezbytný pro udržování vakuolární homeostáze a pro cílení membránových váčků do pozdních endozomů při endocytóze. Delece *FAB1* vede k narušení protonového gradientu na vakuolární membráně, zvětšení vakuol, inhibici růstu při kultivaci při 37 °C a k nesprávnému třídění proteinů v rámci endocytické dráhy (*Gary et al., 1998; Shaw et al., 2003*).

Vzniklý fosfatidylinositol(3,5)-difosfát (PtdIns(3,5)P₂) je také důležitým regulátorem transkripce. PtdIns(3,5)P₂ na membránách endozomů a vakuolární membráně je rozpoznáván Cti6p a Tup1p, což vede ke vzniku komplexu Cti6p-Cyc8p-Tup1p. Tento komplex poté v jádře působí jako koaktivátor transkripce, např. genu *GALI*. Kromě toho hraje významnou roli ve změně metabolismu z glykolýzy na glukoneogenezi indukcí transkripce genů pro glukoneogenezi. Pokud v buňce není dostatek PtdIns(3,5)P₂ a zdrojem uhlíku není glukóza, Cti6p je volně v cytoplazmě a komplex Cyc8p-Tup1p působí v jádře jako obecný korepresor transkripce, včetně genů pro glukoneogenezi (*Han a Emr, 2011; Han a Emr, 2013*).

3.3 Protein Vps34 u jiných organismů

Candida albicans

U patogenní kvasinky *C. albicans* vede delece *VPS34* k úplné ztrátě virulence u myšího modelu systémové infekce (infekce vnitřních orgánů). Je narušena sekrece aspartylových proteáz a pravděpodobně také některých povrchových proteinů zprostředkovávajících adhezi k hostitelským buňkám – zřejmě vlivem nefunkčního vnitrobuněčného transportu či exocytózy. V porovnání s kvasinkou *S. cerevisiae* delece *VPS34* inhibuje růst při 37 °C jen mírně a zcela jej zastavuje až při 42 °C. Buňky rostoucí na pevném médiu nejsou schopné vytvářet hyfy a tvorba hyf v tekutém médiu je v porovnání s rodičovským kmenem výrazně opožděna. Oproti tomu hyfální růst v matrici je při deleci *VPS34* zvýšen, což svědčí o ztrátě regulace. Rovněž je zvýšena citlivost vůči iontům kovů a fungicidům. Vps34p se tedy zdá být slibným cílem pro vývoj nových léčiv proti kvasinkovým infekcím (*Bruckmann et al., 2000; Kitanovic et al., 2005*).

Cryptococcus neoformans

Podobně jako u *C. albicans*, i u této patogenní kvasinky způsobí delece *VPS34* kompletní ztrátu virulence u myšího modelu systémové choroby. Protein Vps34 je nezbytný pro autofágii a bez něj buňky nepřežívají ve stresových podmínkách (např. při hladovění) a záhy odumírají. To vede k urychlené aktivaci imunitní odpovědi na přítomnost tohoto patogenu (v řádu hodin namísto dní) a k odstranění těchto buněk makrofágy (*Hu et al., 2008*).

Savci

Protein Vps34 (PI3K třídy III) se u savců podílí (podobně jako Vps34p u *S. cerevisiae*) na regulaci váčkového transportu a autofágie. Autofágie je pro buňky klíčová pro překonání

stresových podmínek jako je hladovění (chrání buňky před apoptózou i nekrózou), hypoxie či poškození DNA. Zároveň hraje roli v řadě fyziologických procesů včetně vývoje orgánů a imunity. Autofágie má také tumorsupresivní účinky, avšak po přeměně buňky na rakovinou buňku je autofágie nadále využívána pro odolnost vůči stresovým podmínkám – včetně chemoterapeutické léčby (*shrnutí v Farkas et al., 2011*).

Funkce Vps34 je narušena také u některých myopatií (např. Danonova choroba) a neurodegenerativních onemocněních způsobených hromaděním nesprávně složených proteinů v buňkách. Vzácná mutace v promotoru lidského genu *VPS34* je spojována s bipolární afektivní poruchou a schizofrenií, avšak tyto studie vykazují rozdíly mezi testovanými skupinami, a také použitá statistická metoda není zcela relevantní (*shrnutí v Nicot a Laporte, 2008*).

V buňkách neuronů je Vps34 nezbytný pro lokalizaci amyloidního prekurzorového proteinu (APP) do pozdních endozomů. Pokud je inhibována jeho PI3K aktivita, dochází k endozomálním abnormalitám, k narušení třídění APP do endozomů a k tvorbě amyloidních plaků spojených s Alzheimerovou chorobou. Oblasti mozku postižené touto chorobou vykazují významný pokles koncentrace PtdIns3P, což inhibuje nejen endozomální transport, ale také autofágii. Regulace PI3K aktivity Vps34 je tedy zajímavým cílem pro nové terapie Alzheimerovy choroby (*Morel et al., 2013*).

Jaber a kolektiv zjistili, že pro správnou funkci buněk srdečního svalstva a hepatocytů je nezbytná autofágie. Delece *VPS34* u myši zcela inhibuje autofágii a narušuje endocytózu. Dochází ke zvětšení objemu jater i srdce a k rozvoji jaterní steatózy (hromaděním lipidů v hepatocytech), a ke snížení kontraktility srdečního svalu. Myši, které nemají funkční protein Vps34, nemají po narození viditelné problémy, hynou však ve věku 5 až 13 týdnů (průměrná délka života myši je 1,5-3 roky), zřejmě vinou selhání srdce (*Jaber et al., 2012*).

Vzhledem k výše uvedeným funkcím Vps34 je regulace jeho PI3K aktivity v popředí zájmu. Obvykle používané inhibitory PI3K aktivity – LY-294002, wortmannin a 3-methyladenin však kromě Vps34 inhibují také PI3K třídy I. Jedním ze slibných inhibitorů Vps34 a autofágie je KU-55933 (*Farkas et al., 2011*). KU-55933 byl popsán v roce 2004 jako ATP kompetitivní inhibitor proteinkinázy ATM (člen rodiny PI3K příbuzných kináz), která hraje roli v udržování integrity genomu (*Hickson et al., 2004*). Později se však ukázalo, že KU-55933 je také inhibitorem Vps34, který je selektivní pro PI3K třídy III. Autofágie je inhibována při 2 μ M koncentraci KU-55933 a PI3K aktivita Vps34 je téměř zcela inhibována při 10 μ M koncentraci KU-55933. Výhodou tohoto inhibitoru rovněž je, že v porovnání s jinými inhibitory (např. 3-methyladeninem) nemá cytotoxické účinky (*Farkas et al., 2011*).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Použité mikroorganismy

***Saccharomyces cerevisiae* BR-F**

MATa/MATa, prototrofní přírodní kmen, získán ze sbírky Chemického institutu Akademie věd Slovenské republiky v Bratislavě, kat. číslo CCY 21-4-97. Na glycerolovém médiu (GM) vytváří strukturované kolonie.

***Saccharomyces cerevisiae* BR-F Flo11-GFPp**

MATa/MATa, prototrofní kmen, získán ze sbírky Katedry genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karovy v Praze. Odvozený od kmene BR-F, vytvořený Mgr. Vratislavem Šťovíčkem, PhD.. Kmen produkující fúzní protein GFP-Flo11p lokalizovaný na plazmatické membráně. Na GM vytváří strukturované kolonie.

***Saccharomyces cerevisiae* BR-S**

MATa/MATa, prototrofní kmen, získán ze sbírky Katedry genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karovy v Praze. Odvozený od kmene BR-F. Na GM vytváří hladké kolonie.

***Saccharomyces cerevisiae* BY4742**

MATa his3Δ 1 leu2Δ 0 lys2Δ 0 ura3Δ 0, laboratorní kmen, získán ze sbírky European *Saccharomyces Cerevisiae* Archive for Functional Analysis (EUROSCARF), Institute of Molecular Biosciences, Johann Wolfgang Goethe-University Frankfurt, Německo, kat. číslo Y10000. Na GM vytváří hladké kolonie.

Saccharomyces cerevisiae* BY4742 *vps15Δ

MATa his3Δ 1 leu2Δ 0 lys2Δ 0 ura3Δ 0 vps15Δ::kanMX, laboratorní kmen, získán ze sbírky European *Saccharomyces Cerevisiae* Archive for Functional Analysis (EUROSCARF), Institute of Molecular Biosciences, Johann Wolfgang Goethe-University Frankfurt, Německo. Tento kmen by neměl být schopný růstu na GM, ale mé analýzy ukázaly, že to není deleční kmen *vps15Δ*, ani nenese v genomu kazetu pro rezistenci ke kanamycinu.

Saccharomyces cerevisiae* BY4742 *vps34Δ

MATα his3Δ 1 leu2Δ 0 lys2Δ 0 ura3Δ 0 vps34Δ::kanMX, laboratorní kmen, získán ze sbírky European *Saccharomyces Cerevisiae* Archive for Functional Analysis (EUROSCARF), Institute of Molecular Biosciences, Johann Wolfgang Goethe-University Frankfurt, Německo. Tento kmen by neměl být schopný růstu na GM, ale mé analýzy ukázaly, že je to směs buněk, z nichž pouze některé jsou *vps34Δ*. Po přečištění neroste na GM.

***Saccharomyces cerevisiae* PORT**

MATα/MATα, prototrofní přírodní kmen, získán ze sbírky Katedry genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karovy v Praze. Monoklonální izolát přírodního vinařského kmene WY63 získaného od Dorit Schuller z Universidade do Minho, Braga, Portugalsko. Na GM vytváří hladké kolonie, na GM + 0,05mM Se vytváří strukturované kolonie.

***Saccharomyces cerevisiae* ΣS^h**

MATα, laboratorní kmen odvozený od diploidního kmene Σ1278, získán ze sbírky Katedry genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karovy v Praze. Na GM vytváří strukturované kolonie.

4.1.2 Připravené kvasinkové kmeny

Tab. 4.1: Seznam kvasinkových kmenů připravených v rámci diplomové práce

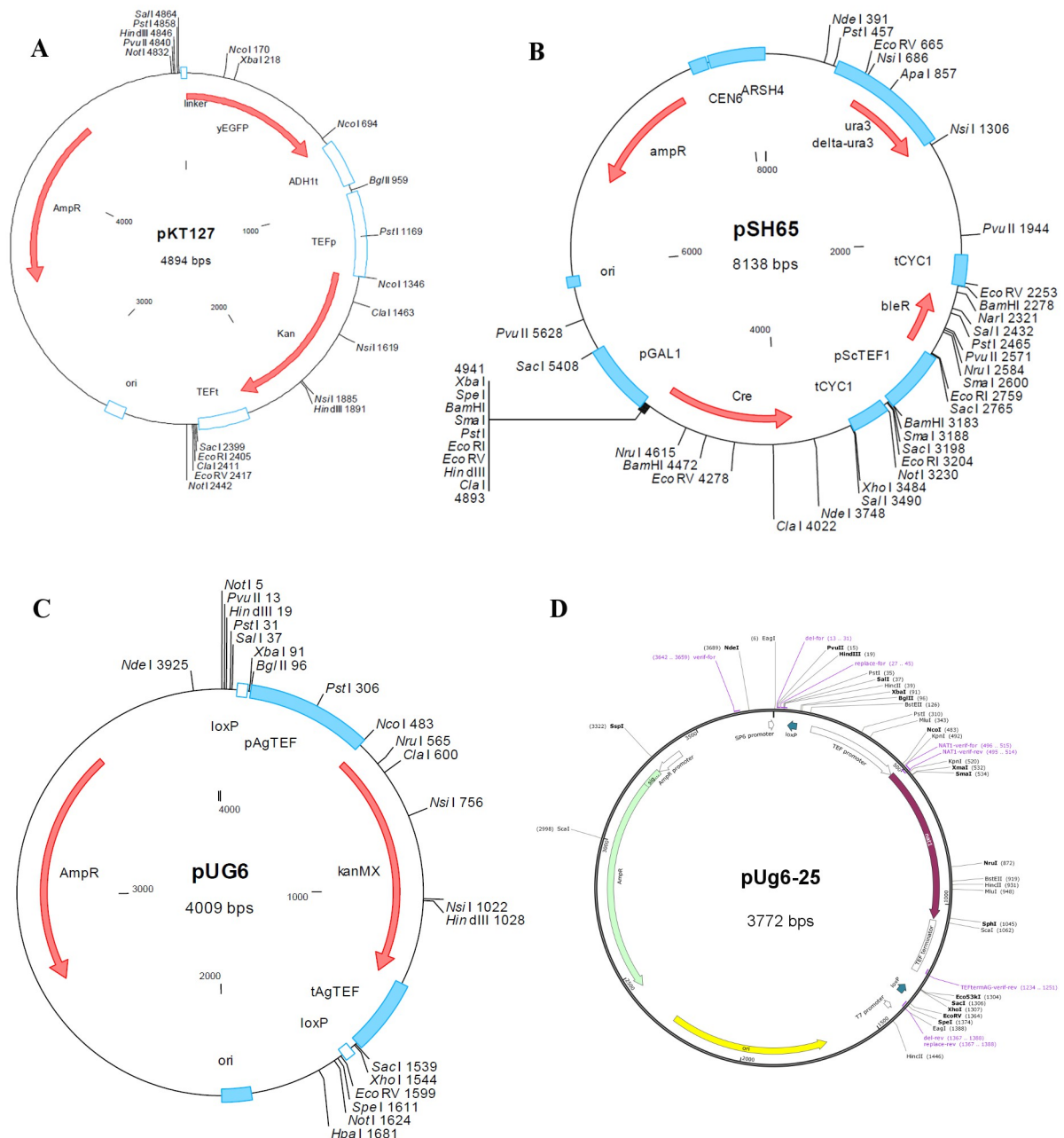
Název kmene	Genotyp
BR-F <i>TEF-VPS34</i>	<i>MATα/MATα TEF-VPS34-kanMX/VPS34</i>
BR-F <i>vps34/vps34/VPS34*</i>	<i>MATα/MATα vps34Δ::kanMX/vps34Δ::nat1/VPS34</i>
BR-F <i>vps34/vps34/vps34/VPS34*</i>	<i>MATα/MATα vps34Δ/vps34Δ/vps34Δ::kanMX/VPS34</i>
BR-F <i>Vps34p-GFP</i>	<i>MATα/MATα VPS34-EGFP-kanMX/VPS34</i>
BR-F <i>Flo11p-GFP TEF-VPS34</i>	<i>MATα/MATα TEF-VPS34-kanMX/VPS34 FLO11-EGFP/FLO11</i>
BR-F <i>Flo11p-GFP vps34/vps34/VPS34*</i>	<i>MATα/MATα vps34Δ::kanMX/vps34Δ::nat1/VPS34 FLO11-EGFP/FLO11</i>
BR-S <i>TEF-VPS34</i>	<i>MATα/MATα TEF-VPS34-kanMX/VPS34</i>
PORT <i>TEF-VPS34</i>	<i>MATα/MATα TEF-VPS34-kanMX/VPS34</i>
PORT <i>vps34/vps34/VPS34*</i>	<i>MATα/MATα vps34Δ::kanMX/vps34Δ::nat1/VPS34</i>
PORT <i>vps34/vps34/vps34/VPS34*</i>	<i>MATα/MATα vps34Δ/vps34Δ/vps34Δ::kanMX/VPS34</i>
PORT <i>Vps34p-GFP</i>	<i>MATα/MATα VPS34-EGFP-kanMX/VPS34</i>
BY4742 <i>vps15</i>	<i>MATα his3Δ 1 leu2Δ 0 lys2Δ 0 ura3Δ 0 vps15Δ::kanMX</i>
BY4742 <i>TEF-VPS34</i>	<i>MATα his3Δ 1 leu2Δ 0 lys2Δ 0 ura3Δ 0 TEF-VPS34-kanMX</i>
BY4742 <i>Vps34p-GFP</i>	<i>MATα his3Δ 1 leu2Δ 0 lys2Δ 0 ura3Δ 0 VPS34-EGFP-kanMX</i>
ΣS^h <i>vps15</i>	<i>MATα vps15Δ::nat1</i>

ΣS^h <i>TEF-VPS34</i>	<i>MATa TEF-VPS34-kanMX</i>
ΣS^h <i>vps34/VPS34*</i>	<i>MATa vps34Δ::kanMX/VPS34</i>
ΣS^h <i>Vps34p-GFP</i>	<i>MATa VPS34-EGFP-kanMX</i>

* Přestože gen *VPS34* je v diploidních buňkách ve dvou kopiích, připravené kmeny mají odstraněné 2, případně 3 alely *VPS34* a stále nesou další alelu (nebo alely) *VPS34*. Podobně je tomu u haploidního kmene ΣS^h .

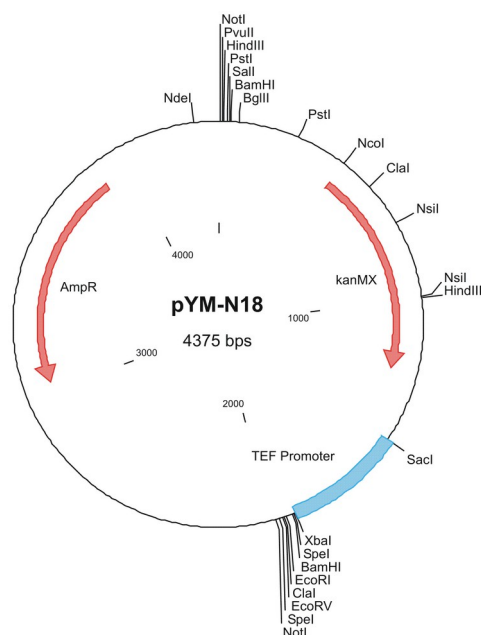
4.1.3 Použité plazmidy

Templátová DNA pro přípravu transformačních kazet: plazmidy pKT127, pSH65, pUG6, pUG6-25 a pYM-N18. Podrobný popis použitých plazmidů je v Tab. 4.2.



Obr. 4.1: Mapy plazmidů pKT127 (A), pSH65 (B), pUG6 (C) a pUG6-25 (D)

Mapy plazmidů (A-C) převzaty z European *Saccharomyces Cerevisiae* Archive for Functional Analysis (EUROSCARF), Institute of Molecular Biosciences, Johann Wolfgang Goethe-University Frankfurt, Německo (<http://web.uni-frankfurt.de>). Mapa plazmidu D byla vytvořena Ing. Otakarem Hlaváčkem, PhD.



Obr. 4.2: Mapa plazmidu pYM-N18

Mapa plazmidu převzata z European Saccharomyces Cerevisiae Archive for Functional Analysis (EUROSCARF), Institute of Molecular Biosciences, Johann Wolfgang Goethe-University Frankfurt, Německo (<http://web.uni-frankfurt.de>).

Tab. 4.2: Plazmidy použité v rámci diplomové práce

Název plazmidu	Popis plazmidu
pKT127	Plazmid pro přípravu kazet na C-koncové značení proteinu pomocí GFP. Nese geny <i>yEGFP</i> , <i>kanMX</i> a <i>AmpR</i> . Jako selekční marker u <i>S. cerevisiae</i> slouží <i>kanMX</i> (rezistence ke G418). Velikost plazmidu je 4894 bp.
pSH65	Plazmid pro produkci <i>cre</i> rekombinázy. Nese geny <i>delta-ura3</i> , <i>bleR</i> , <i>Cre</i> (exprese řízena inducibilním promotorem z genu <i>GAL1</i>) a <i>AmpR</i> . Jako selekční marker u <i>S. cerevisiae</i> slouží <i>bleR</i> (rezistence k phleomycinu). Velikost plazmidu je 8138 bp.
pUG6	Plazmid pro přípravu delečních kazet. Nese geny <i>kanMX</i> a <i>AmpR</i> . Jako selekční marker u <i>S. cerevisiae</i> slouží <i>kanMX</i> (rezistence ke G418). Obsahuje <i>loxP</i> místa – vložená kazeta může být odstraněna pomocí <i>cre</i> rekombinázy a plazmid může být použit opakovaně. Velikost plazmidu je 4009 bp.
pUG6-25	Plazmid pro přípravu delečních kazet. Nese geny <i>nat1</i> a <i>AmpR</i> . Jako selekční marker u <i>S. cerevisiae</i> slouží <i>nat1</i> (rezistence k nourseothricinu). Obsahuje <i>loxP</i> místa – vložená kazeta může být odstraněna pomocí <i>cre</i> rekombinázy a plazmid může být použit opakovaně. Velikost plazmidu je 3772 bp.
pYM-N18	Plazmid pro přípravu kazet pro konstitutivní expresi genu řízenou promotorem TEF. Nese geny <i>kanMX</i> , <i>AmpR</i> a TEF promotor. Jako selekční marker u <i>S. cerevisiae</i> slouží <i>kanMX</i> (rezistence ke G418). Velikost plazmidu je 4375 bp.

4.1.4 Použité primery

Primery pro přípravu transformačních kazet i ověřovací primery pro kontrolu úspěšnosti transformace byly objednány od společnosti Sigma-Aldrich. Seznamy připravených a použitých primerů jsou uvedeny v Tab. 4.3 a 4.4. Primery přímé jsou označeny písmeny Fw a primery

reverzní písmenem R. Polohy jednotlivých primerů jsou uvedeny pro sekvenci daného genu, která kromě kódující sekvence zahrnuje ještě 1 kbp před a 1 kbp za kódující sekvencí. Pro navrhování primerů byl použit program Primer z balíčku CLONE a kvalita navržených primerů byla kontrolována pomocí programu OligoAnalyzer 3.1.

Tab. 4.3: Seznam primerů pro přípravu kazet pro transformaci

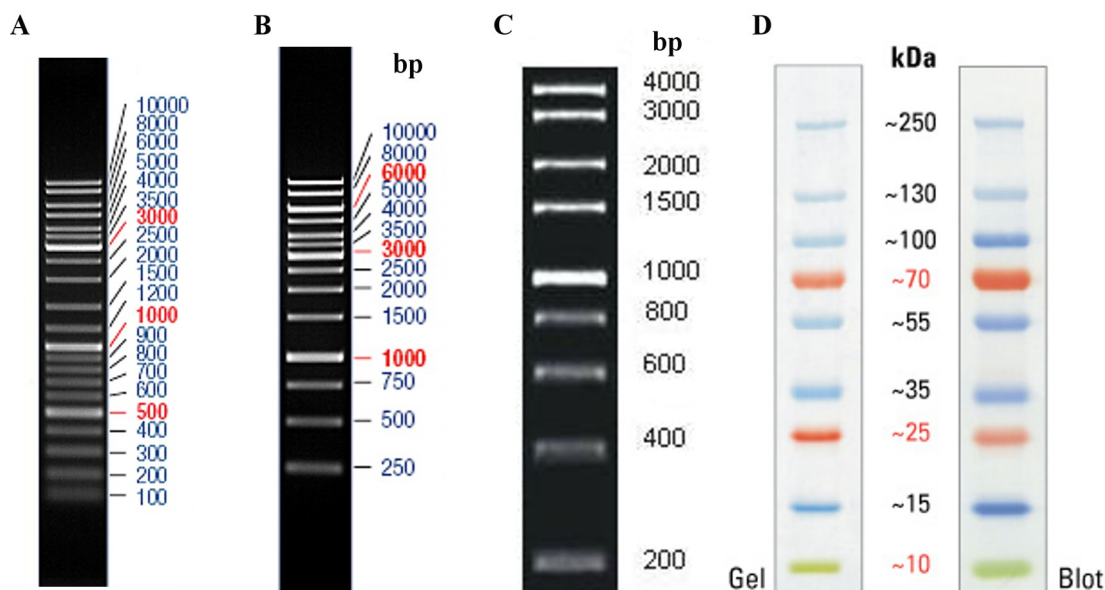
Název primeru	Sekvence primeru ve směru 5' → 3'	Pozice primeru
<i>VPS34</i> FD1	AATGTCACTGAACAACATAACATTCTGTGTCTCACAGGATCTGGACAGCTGAAGCTTCGTACGC	1000
<i>VPS34</i> RD1	CAGGTCCGCCAGTATTGTGCCAGATTATGTAAATGATCAATCACGGCATAGGGCCACTAGTGGATCTG	3627
<i>VPS34</i> FD2	CAAATGTATTCCCTTCTAGTGATCTAATTGTATCCTTACAGGTATCAGCTGAAGCTTCGTACGC	1143
<i>VPS34</i> RD2	ATCACGATAGGCAGCAAAGCATTACACTATCATTGATTAGATTCGCATAGGGCCACTAGTGGATCTG	3588
TEF- <i>VPS34</i> F	CAATAACATCTCCGTGAAGCATTGAGGGAAGGGTTAACTCCAACACGTACGCTGCAGGTCGAC	1000
TEF- <i>VPS34</i> R	GAACATCCAGATCCTGTGAGACACAGAATGTTATGTTGTTCACTGACATCGATGAATTCTCTGTCTG	1001
<i>VPS34</i> -GFP F	TATCGTGATTGATCATTTACATAATCTGGCACAATACTGGGGTGACGGTGCTGGTTTA	3580
<i>VPS34</i> -GFP R	TGAAGGTACCATTATATGTTAAGTATAATTAGAGTGACGTCGATGAATTCGAGCTCG	3702
<i>VPS15</i> FD	GGTTATCAAAAAGGAAGGCATACAGTATAATGGGGGCACACAGCTGAAGCTTCGTACGC	972
<i>VPS15</i> RD	AGCAAAGGTGTCTCATCAACTTCACATGTAGATATAGAATGCATAGGGCCACTAGTGGATCTG	5322

Tab. 4.4: Seznam ověřovacích primerů

Název primeru	Sekvence primeru ve směru 5' → 3'	Pozice primeru
<i>VPS34</i> A	TTCATTGCCATAACCTTGTC	461
<i>VPS34</i> A2	GAGTGAATTGTAGATGTCTG	642
<i>VPS34</i> B	TTGTTATCAGTGACCACTTC	1482
<i>VPS34</i> C	TCTTAGGTGTCGGCGATAGG	3177
<i>VPS34</i> D	CAGGACGGTAAGCGAAGGTT	4173
<i>VPS34</i> E	CCTGATGTGTTGATATGCGACG	2753
<i>VPS34</i> F	AATGCCTATCGCCGACACCTAA	3200
<i>VPS15</i> A	CACGAGACAGTACCATTGGA	710
<i>VPS15</i> B	ACAGGTTCTTCTCTTCGAGG	1585
<i>VPS15</i> E	TGAGCGACTTGGCCATTATC	2607
<i>VPS15</i> F	TCCATGACGGTAGATAGCTG	3903
<i>KanMX</i> Fw	GATACCAGGATCTTGCCATC	—
<i>KanMX</i> R	CTGATTGCCCGACATTATCG	—
<i>Nat</i> Fw	GAGGTCACCAACGTCAAC	—
<i>Nat</i> R	GAGTACGAGATGACCACGAA	—
<i>yEGFP</i> Fw	TTGGTGATGGTCCAGTCTTG	—

yEGFP R	CGGAGACAGAAAATTTGTGAC	–
pYM-N18 Fw	AAGCATAGCAATCTAATC	–
RPL3 Fw	CTGCCTCCATCAGAGCTAGA	1065
RPL3 R	CCGAACCTTAGAAGCAGTGTC	2097
OPI3 Fw	CAAGTCAAGCGATGAAGGAG	990
OPI3 R	GTTAGCGTAGATCATGGCAG	1594

4.1.5 Použité standardy molekulových hmotností



Obr. 4.3: Standardy molekulových hmotností nukleových kyselin a proteinů

Standardy molekulových hmotností fragmentů nukleových kyselin pro DNA elektroforézu (A, B; GeneRuler™ DNA Ladder, (Thermo scientific)), standard molekulových hmotností fragmentů nukleových kyselin pro RNA elektroforézu (C; 1kb RNA Ladder (Norgen Biotek)), standard molekulových hmotností proteinů pro SDS-PAGE (D; PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo scientific)).

4.1.6 Chemikálie

Název	Zkratka/chemický vzorec	Dodavatel
6× DNA Loading Dye		MBI Fermentas
10mM dNTP		Top-Bio
Agar		Dr. Kulich Pharma
Agaróza, for routine use (DNase and RNase free)		Sigma
Akrylamid	C_3H_5NO	MP Biomedicals
Bromfenolová modř	$BFM/C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	Bio-Rad
Bromkresolpurpur	$BKP/C_{21}H_{16}Br_2O_5S$	Sigma-Aldrich
Calcofluor White Stain	CFW	Fluka Analytical

Coomassie Brilliant Blue R-250	$\text{CBB/C}_{45}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}_2$	Serva
D-glukóza	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Spofa
Dimethyl sulfoxid	$\text{DMSO/C}_2\text{H}_6\text{OS}$	Top-Bio
DL-Dithiothreitol	$\text{DTT/C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$	Sigma
Dodecylsulfát sodný	$\text{SDS/NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$	Sigma
Ethanol 96% (v/v)	$\text{EtOH/C}_2\text{H}_6\text{O}$	Penta, Lach-Ner
Ethidium bromid	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$	Serva
Ethylendiamintetraacetát	$\text{EDTA/C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	Serva
Fenol pro DNA	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$	Sigma
Fenol pro RNA	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$	Sigma-Aldrich
Fenylmethansulfonyl fluorid	$\text{PMSF/C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$	Fluka
Glycerol bezvodý	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	Lach-Ner
Glycin	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	Serva
Hovězí sérový albumin	BSA	Invitrogen™
Hydroxid sodný	NaOH	Lachema, Lach-Ner
Chloroform	CHCl_3	Lachema
Igepal CA-630 (Nonidet P-40)	$(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}$	Fluka
Inhibitor proteáz Mix FY	PIC	Serva
Isoamylalkohol	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$	Lachema
Isopropanol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$	Penta, Lachema
Kasein z hovězího mléka		Sigma
Kvasničný autolyzát (šarže č. 41/83)	YE	IMUNA PHARM
Kvasničný autolyzát (šarže č. 904149)	YE	AES Laboratoire
Kyselina boritá	H_3BO_3	Lachema
Kyselina chlorovodíková (35%)	HCl	Penta
Kyselina octová	CH_3COOH	Penta
Kyselina orto-fosforečná (85%)	H_3PO_4	Lachema
Kyselina peroctová (35%) Persteril®36	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$	OVERLACK
KU-55933	$\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{S}_2$	MedChem Express
LA pufř		Top-Bio
Merkaptoethanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$	Sigma-Aldrich
Methanol	CH_3OH	Merck KgaA
N, N'-methylen-bis-akrylamid	$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$	Serva

N, N, N', N'-tetramethyletylendiamin	TEMED/ $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	Serva
Octan amonný	$\text{C}_2\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$	Lachema
Octan sodný bezvodý	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$	Fluka
Persíran amonný	APS/ $\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$	Serva
Polyethylenglykol	PEG/ $\text{C}_{2n}\text{H}_{4n+2}\text{O}_{n+1}$	Serva, Sigma
Salmon sperm DNA	ssDNA	BioLabs
Selenan sodný	Na_2SeO_4	Sigma-Aldrich
Síran kademnatý oktahydrát	$3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	Lachema
Síran měďnatý pentahydrát	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Lachema
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	Sigma, Serva
Tween® 20	$\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$	Sigma

4.1.7 Enzymy

Emerald Amp MAX PCR Master Mix (TaKaRa) – pro přípravu transformačních kazet

Emerald Amp GT PCR Master Mix (TaKaRa) – pro ověřovací PCR

LA DNA polymeráza (Top-Bio) – pro přípravu transformačních kazet

OneTaq® (New England Biolabs) – pro ověřovací PCR a pro přípravu transformačních kazet

PPP PCR Master Mix (Top-Bio) – pro ověřovací PCR

Ribonukleáza A (Sigma) – pro odstranění RNA ze vzorků DNA

Zymolýza (MP Biomedicals) – pro odstranění buněčné stěny

4.1.8 Antibiotika

Edicin (Edi) – (SANDOZ) – obsahuje vankomycin, který blokuje syntézu buněčné stěny prokaryot.

Geneticin (G418) – (MP Biochemicals) – inhibuje elongaci polypeptidu v průběhu translace. Působí na prokaryotní i eukaryotní buňky.

Nourseothricin (NAT) – (WERNER BioAgents) – inhibuje syntézu polypeptidu zavedením chyb v průběhu translace. Působí na prokaryotní i eukaryotní buňky.

Phleomycin (Phle) – (InvivoGen) – vmezeřuje se do DNA a způsobuje dvouvláknové zlomy. Působí na prokaryotní i eukaryotní buňky.

4.1.9 Ostatní materiál

Fotografické filmy (Fomei a.s.)

Práškový RTG rychloustalovač (Adefo-chemie GmbH) – připraven podle pokynů výrobce

Vyvíjecí kazety (Cawo ABS cassette)

Vývojka Röntgen Rapid Entwickler (Adefo-chemie GmbH) – připravena podle pokynů výrobce

4.1.10 Kultivační média

Tekutá média:

Galaktóza:	2% (w/v) galaktóza 1% (w/v) kvasničný autolyzát (šarže č. 83), <i>upravené pH = 6,5</i>
GM:	3% (v/v) glycerol 1% (w/v) kvasničný autolyzát (šarže č. 83)
YD:	2% (w/v) glukóza 1% (w/v) kvasničný autolyzát (šarže č. 83)
Médium + 0,05mM Se:	GM nebo YD 0,05mM Na ₂ SeO ₄
skladovací médium:	60% (v/v) glycerol 10% (w/v) glukóza 2% (w/v) pepton 1% (w/v) kvasničný autolyzát (šarže č. 83)

Pevná média:

GM:	3% (v/v) glycerol 1% (w/v) kvasničný autolyzát (šarže č. 83) 2% (w/v) agar
YD:	2% (w/v) glukóza 1% (w/v) kvasničný autolyzát (šarže č. 83) 2% (w/v) agar
EM:	3% (v/v) ethanol (96%) 1% (w/v) kvasničný autolyzát (šarže č. 83) 2% (w/v) agar
Médium s antibiotikem:	GM nebo YD 0,002% (w/v) edicin 0,02% (w/v) geneticin – pro přírodní kmeny 0,04% (w/v) geneticin – pro laboratorní kmeny 0,01% (w/v) nourseothricin 0,003% (w/v) phleomycin (<i>pH kvasničného autolyzátu = 6,5</i>)

Médium + 0,05mM Se: GM nebo YD
0,05mM Na_2SeO_4

GM + BKP:
(přírodní kmeny) GM
0,01% (w/v) bromkresolpurpur (BKP)
1% (v/v) ethanol (96%)

pH kvasničného autolyzátu (šarže č. 83) upraveno 10M HCl na pH 5,0

GM + BKP:
(laboratorní kmeny) GM
10mM CaCl_2
0,05% (w/v) glukóza
0,18mM uracil
1% (v/v) ethanol (96%)
0,01% (w/v) bromkresolpurpur (BKP)

pH kvasničného autolyzátu (šarže č. 41) upraveno 10M HCl na pH 5,0

4.2 Metody

4.2.1 Sterilizace

Špičky k mikropipetám, mikrozkušavky, párátko, roztoky a média byly sterilizovány v autoklávu 20 minut při tlaku 120 kPa. Materiál a roztoky používané pro práci s RNA byly autoklávovány dvakrát. Plastické centrifugační zkumavky a mikrotitrační destičky byly sterilizovány parami kyseliny peroctové v uzavřeném polyethylenovém sáčku po dobu nejméně 24 hodin. Chemické sklo bylo sterilizováno suchým teplem v sušárně při teplotě 180 °C po dobu 3 hodin. Skleněné tyčinky používané při mikrobiologickém výsevu byly sterilizovány namočením v ethanolu s následným opálením v plameni.

4.2.2 Práce s kvasinkami

Kultivace

Kvasinkové kultury jsem inkuboval na pevných médiích v termostatu při teplotě 28 °C, případně při 37 °C. Při submerzní kultivaci jsem kultury inkuboval v Erlenmeyerových baňkách na rotační třepačce (Kühner, Lab-Therm; Multitron Standard, INFORS HT) při teplotě 28 °C (pokud není uvedeno jinak).

Uchovávání zásobních kultur

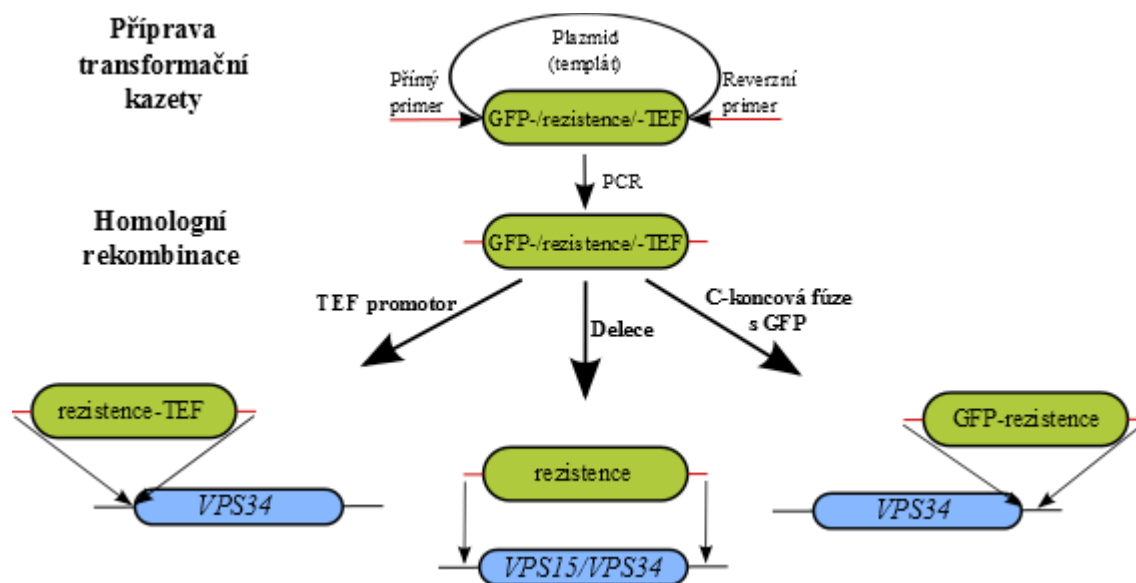
Kvasinkové kultury jsem uchovával dlouhodobě v mikrozkmavkách ve skladovacím médiu při -80 °C.

Stanovení počtu buněk a měření optické denzity (OD) kvasinkové kultury

Koncentraci buněk v suspenzi jsem stanovoval počítáním buněk v Bürkerově počítací komůrce ve světelném mikroskopu (Meopta Praha) při celkovém zvětšení 400×, případně spektrofotometricky na spektrofotometru (Novaspec Plus, Amersham Biosciences) při vlnové délce 600 nm. Optickou denzitu jsem měřil v plastové kyvetě s optickou dráhou 1,0 cm. V oblasti OD ~0,2-0,5 platí, že hodnota 0,1 je přibližně $1 \cdot 10^6$ buněk/ml. Jako blank jsem používal destilovanou vodu, nebo dané kultivační médium bez buněk.

4.2.3 Transformace

Kvasinkové kmeny připravené v rámci této diplomové práce byly připraveny pomocí homologní rekombinace. Jednotlivé kroky jejich přípravy jsou popsány v následujících podkapitolách.



Obr. 4.4: Schéma přípravy transformačních kazet a jejich integrace homologní rekombinací do genomu

Transformační kazety byly připraveny pomocí PCR. Templátovou DNA byl daný plazmid a primery měly vedle části komplementární k plazmidu také část komplementární k cílovému genu (*VPS15/VPS34*). Pomocí homologních úseků došlo poté k integraci transformační kazety do genomu (spodní část obrázku).

Příprava transformačních kazet

Pro přípravu transformačních kazet jsem do tenkostěnných PCR mikrozkušavek namíchal reakční směs o celkovém objemu 50 μ l s níže uvedeným složením:

25 μ l 2 \times koncentrovaného PCR mixu*
2 μ l templátové (plazmidové) DNA
2 μ l 5 pmol/ μ l přímého primeru
2 μ l 5 pmol/ μ l reverzního primeru
19 μ l sterilní demi H₂O

Směs jsem promíchal (Vortex Genie 2, Scientific Industries), centrifugoval 60 s při 2 000g (centrifuga Spectrafuge 24D, Labnet International), vložil do PCR cykléru** a spustil program popsáný v Tab. 4.5. Kvalitu připravené kazety (molekulovou hmotnost a specifitu PCR) jsem ověřil pomocí horizontální DNA elektroforézy v agarózovém gelu.

Tab. 4.5: Program PCR reakce pro přípravu transformačních kazet

1.	94 °C (počáteční denaturace dsDNA)	3 min	
2.	94 °C (denaturace dsDNA)	30 s	35 cyklů
3.	54 °C (nasedání primerů)	30 s	
4.	68 °C/72 °C ¹ (prodlužování primerů)	90-150 s ²	
5.	68 °C/72 °C ¹ (dosyntetizování)	5 min	
6.	4 °C (skladování reakce)	∞	

¹ teplota syntézy se lišila v závislosti na použitém PCR mixu. ² doba syntézy byla 90 s pro deleční kazety a 150 s pro transformační kazety pro přípravu kmenů s GFP fúzí a pro arteficiální zvýšení exprese.

* Pro přípravu kazet jsem používal Emerald Amp MAX PCR Master Mix (TaKaRa), OneTaq® (New England Biolabs) a LA polymerázu.

** K izolaci DNA, pro přípravu transformačních kazet, pro ověřovací PCR a pro přípravu PCR produktů k využití jako templátů pro sekvenaci jsem používal PCR termocykléry BIOER GenePRO, MiniCycler™ (MJ Research) a gradientový BIOER XP.

Transformace buněk LiAc/ssDNA/PEG metodou (podle Gietz a Woods, 2002)

Tab. 4.6: Transformační směs

Reagencie	Objem na 1 transformaci
50% (w/v) PEG 3500	240 μ l
1M LiAc	36 μ l
Salmon Sperm ssDNA (10 mg/ml)	12,5 μ l
Sterilní dest. H ₂ O	Doplněno do 360 μ l
Transformační DNA	5 μ l v případě plazmidu, 5-15 μ l v případě PCR produktu
Celkový objem	360 μ l

Buňky pro transformaci jsem nejprve inkuboval v 15 ml YD média s 0,002% (w/v) edicinem přes noc (O. N.) na třepačce při 28 °C (inokulum bylo cca 2 mm³ biomasy).

Druhý den jsem z O. N. kultury zaočkoval 1 ml do 30 ml čerstvého YD média s 0,002% (w/v) edicinem a inkuboval další 3-4 hodiny na třepačce při 28 °C. Poté jsem spektrofotometricky ověřil, že kultury jsou narostlé do správné denzity ($>2 \cdot 10^7$ buněk/ml). Buňky jsem centrifugoval 5 minut při 3 000g (centrifuga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen), promyl 25 ml sterilní dest. H₂O, centrifugoval 5 minut při 3 000g a resuspendoval (Vortex Genie 2, Scientific Industries) v 1 ml sterilní dest. H₂O. Tuto buněčnou suspenzi jsem přenesl do mikrozkušavky, zcentrifugoval 1 minutu při 11 500g (centrifuga Hettich Mikro 200, Hettich Zentrifugen). Odstranil jsem supernatant a buňky resuspendoval ve sterilní dest. H₂O tak, aby koncentrace buněk byla 10⁹ na 1 ml. Z této suspenze jsem odebral 100 µl pro každou transformační reakci, centrifugoval 1 minutu při 11 500g a odstranil supernatant.

Ke 100 µl buněčné suspenze (~10⁸ buněk) jsem přidal 360 µl připravené transformační směsi (Tab. 4.6), promíchal a inkuboval 40 minut při 42 °C ve vodní lázni (Barnstead International, Lab-Line). Směs jsem poté centrifugoval a odstranil supernatant. Buňky jsem resuspendoval v YD médiu s edicinem, přenesl do 15ml zkumavky pro lepší aeraci a inkuboval 2-3 hodiny na třepačce při 28 °C.

Transformační směs jsem vyséval na plotny s vhodným antibiotikem a inkuboval 3-5 dní (YD médium) nebo 5-7 dní (GM médium) při 28 °C.

Ověřování vložení transformační kazety u kmenů s nahrazením/modifikací 1 alely

Po 3-5 dnech (v případě výsevu na selekční médium s glukózou), případně po 3-7 dnech (v případě výsevu na selekční médium s glycerolem) po transformaci jsem přečárkoval narostlé kolonie na nové plotny se stejným selekčním antibiotikem a kultivoval v termostatu při 28 °C přes noc.

Další den jsem u rezistentních klonů ověřil vložení transformační kazety pomocí PCR s následnou horizontální DNA elektroforézou v agarózovém gelu. Použil jsem ověřovací primer A daného genu (nasedající před kódující sekvencí genu) a reverzní primer genu pro rezistenci, případně přímý primer genu pro rezistenci a ověřovací primer B našeho genu (nasedající do kódující sekvence genu). Při přípravě kmenů s GFP fúzí jsem použil primer KanMX fw, nebo yEGFP fw a ověřovací primer B našeho genu.

Klony, u kterých jsem potvrdil vložení transformační kazety do sledovaného lokusu, jsem

purifikoval výsevem. Po 3-5 dnech jsem přečárkoval narostlé kolonie na plotny se selekčním antibiotikem, kultivoval O. N. v termostatu při 28 °C a následně pomocí PCR znovu ověřil vložení transformační kazety do lokusu modifikovaného genu. Pozitivní klony jsem uchovával ve skladovacím médiu při -80 °C.

Ověřování vložení transformační kazety u diploidních kmenů s delecí obou alel genu

Buňky po transformaci jsem vyséval na plotny s antibiotikem odpovídajícím rezistenci v právě vnášené delecí kazetě, případně na plotny s antibiotiky odpovídajícími rezistencím v obou delecí kazetách. Narostlé klony jsem po 3-5 dnech (YD), případně po 3-7 dnech (GM) po transformaci přečárkoval současně na nové plotny se selekčním antibiotikem, vůči kterému byl rezistentní původní kmen s odstraněnou 1 alelou genu i na plotny s antibiotikem, proti kterému měl rezistenci získat.

Následující den jsem z klonů rezistentních k oběma antibiotikům vyizoloval DNA a pomocí PCR reakcí ověřil vložení druhé delecí kazety a současně přítomnost první delecí kazety. Klony pozitivní pro obě delecí kazety jsem přečistil výsevem na YD či GM.

Po 3-5 dnech po výsevu jsem vyčárkoval narostlé kolonie paralelně na plotny s antibiotiky, proti kterým byly vnášeny rezistence. Následující den jsem vyizoloval DNA z klonů rezistentních k oběma antibiotikům a pomocí PCR potvrdil vložení delecí kazet. Rovněž jsem ověřil, že v genomu klonu není již přítomna další alela sledovaného genu.

Pozitivní klony s odstraněnými oběma alelami sledovaného genu jsem uložil do skladovacího média do -80 °C.

Ověření vložení konstruktu pomocí PCR

Tab. 4.7: Složení PCR směsi a podmínky PCR

Reakční směs	
Enzym	5 μl
Demi H ₂ O	2 μl
Přímý primer 5 pmol·μl ⁻¹	1 μl
Zpětný primer 5 pmol·μl ⁻¹	1 μl
Templátová DNA	1 μl

Podmínky PCR			
1.	94 °C (počáteční denaturace dsDNA)	3 min	
2.	94 °C (denaturace dsDNA)	30 s	30/35 cyklů
3.	52-67 °C (nasedání primerů) ¹	30 s	
4.	68 °C/72 °C ² (prodlužování primerů)	90 s	
5.	68 °C/72 °C ² (dosyntetizování)	5 min	
6.	4 °C (skladování reakce)	∞	

¹ teplota nasedání primerů se lišila v závislosti na použitých primerech. ² teplota syntézy se lišila v závislosti na použitém PCR mixu.

Složení reakční směsi pro ověřovací PCR pro jednu reakci (10 µl) je uvedeno v Tab. 4.7, stejně jako podmínky PCR. Teplota nasedání primeru se lišila podle použitých primerů a byla stanovena experimentálně pomocí PCR s gradientem teploty nasedání primerů, nebo byla použita teplota nasedání primerů doporučená výrobcem primerů. Pro ověřovací PCR reakce jsem používal PCR mixy Emerald Amp GT PCR Master Mix (TaKaRa), OneTaq® (New England Biolabs) nebo PPP PCR Master Mix (Top-Bio).

Odstranění vložených delečních kazet

Pomocí ověřovací PCR, sekvenace PCR produktů a Southern blot analýzy genomů jsem ověřil, že námi připravené přírodní (diploidní) kmeny s 2 nahrazenými alelami *VPS34* mají nejméně jednu další alelu *VPS34*. Aby bylo možné u těchto kmenů použít při odstranění další alely stejný selekční marker, bylo nutné odstranit vložené deleční kazety s geny pro rezistence pomocí Cre-Lox systému.

Buňky transformované plazmidem pSH65 jsem vysel na GM s phleomycinem (0,003% w/v, pH 6,5) a po 3 dnech kultivace při 28 °C jsem narostlé kolonie přečárkoval na nové GM s phleomycinem. U pozitivních klonů jsem indukoval expresi Cre rekombinázy (pod kontrolou *GAL* promotoru). Nejprve jsem je inkuboval v 5 ml GM s phleomycinem při 28°C na třepačce O. N.. Druhý den jsem zaočkoval 1 ml inokula do 10 ml galaktózového média a inkuboval 4 hodiny při 28°C na třepačce. Poté jsem vyséval buňky na GM. Po 3 dnech jsem narostlé kolonie přerazítkoval na misky s GM, GM + G418, GM + Nat a GM + phleomycin a kultivoval je 2 dny při 28°C. Klony, které nenarostly na miskách s antibiotiky, jsem ověřil pomocí PCR a uložil do skladovacího média do -80 °C.

Ověřování vložení transformační kazety u kmenů s delecí tří alel genu

Ověřování vložení transformační kazety u kmenů se třemi odstraněnými alelami probíhalo stejně jako v případě přípravy monodeletantů, jen s tím rozdílem, že po izolaci DNA z klonů pozitivních po přečištění byla kromě vložení deleční kazety ověřována také přítomnost další alely sledovaného genu.

4.2.4 Práce s nukleovými kyselinami

Izolace DNA z celé kolonie pro PCR (tzv. Colony PCR)

Z kultury rostoucí přibližně 24 hodin (u pomalu rostoucích kultur až 48 hodin) jsem

špičkou mikropipety odebral přibližně 1 mm³ biomasy, resuspendoval jej ve 40 µl 20mM NaOH a denaturoval 15 minut při 94 °C na PCR termocykléru BIOER GenePRO, MiniCycler™ (MJ Research). Poté jsem suspenzi promíchal (Vortex Genie 2, Scientific Industries) a centrifugoval 1 minutu při 2 000g (mikrocentrifuga Spectrafuge 24D, Labnet International). Pro PCR reakci jsem použil 1 µl supernatantu (templátová DNA) na každých 10 µl reakce.

Izolace chromozomální DNA zymolyázovou metodou

Mix I

1M	Tris (pH = 8)
0,5M	EDTA (pH = 8)
0,003% (w/v)	merkapt ethanol
0,01% (w/v)	zymolýza

TE pufr

10mM	Tris-HCl (pH = 7,5)
10mM	EDTA (pH = 8)
0,5% (w/v)	SDS

Buněčnou kulturu jsem kultivoval submerzně v 10 ml YD při 28 °C přes noc na třepačce. Druhý den jsem centrifugoval 1,8 ml kultury 1 minutu při 11 500g (centrifuga Hettich Mikro 200, Hettich Zentrifugen). Supernatant jsem odstranil, sediment resuspendoval ve 150 µl mixu I a inkuboval 1 hodinu v termostatu při 28 °C. Po přidání 20 µl 10% (w/v) SDS a 100 µl 7,5M octanu amonného jsem inkuboval suspenzi 15 minut při -80 °C.

Suspenzi jsem rozmrazil a centrifugoval 15 minut při 20 000g a teplotě 4 °C (centrifuga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). K odebranému supernatantu jsem přidal 6/10 objemu izopropanolu a srážel 15 minut při -80 °C. Poté jsem směs centrifugoval 15 minut při 20 000g a teplotě 4 °C. Supernatant jsem odstranil, sediment vysušil a rozpustil jej ve 100 µl TE pufru při 56 °C.

K rozpuštěnému sedimentu jsem přidal 3 µl RNázy (10 mg/ml), promíchal a inkuboval v termostatu 1 hodinu při 37 °C. Poté jsem přidal 100 µl TE pufru a 200 µl chloroformu, 2 minuty promíchával (Vortex Genie 2, Scientific Industries) a následně centrifugoval 5 minut při 11 500g (centrifuga Hettich Mikro 200, Hettich Zentrifugen). K odebranému supernatantu jsem přidal stejný objem chloroformu a znovu 2 minuty promíchával a následně centrifugoval 5 minut při 11 500g. Poté jsem přenesl supernatant do čisté mikrozkušavky a srážel jej 2,5-násobkem objemu 96% (v/v) ethanolu (vychlazeného na -20 °C) a 1/10 objemu 3M NaAc v -20 °C přes noc.

Druhý den jsem roztok centrifugoval 15 minut při 20 000g a teplotě 4 °C (centrifuga

Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen), omyl pelet 400 μ l 80% (v/v) ethanolu (vychlazeného na -20 °C) a opět centrifugoval 15 minut při 20 000g a teplotě 4 °C. Odstranil jsem supernatant a vysušil DNA pelet, který jsem následně rozpustil v demi H₂O při 56 °C. Rozpuštěnou DNA jsem skladoval v -20 °C.

Kvalitu izolace a čistotu vzorku chromozomální DNA jsem kontroloval spektrofotometricky (NANODROP 1000, Thermo Scientific) a elektroforetickou analýzou DNA.

Elektroforetická analýza DNA

1× TBE pufr

0,2M Tris

10mM EDTA (pH = 8)

0,45M kyselina boritá

Pro analýzu produktů PCR reakcí jsem používal horizontální DNA elektroforézu v agarózovém gelu. Agarózu (v kvalitě pro DNA elektroforézu) v patřičném množství pro vytvoření 0,8% (w/v) gelu jsem rozvařil v 1× TBE pufru. Po ochlazení jsem přidal roztok ethidium bromidu (0,1 μ g/ml gelu) a nalil gel do vaničky z plexiskla s hřebenem. Elektroforéza probíhala v elektroforetické aparatuře (OWL EASYCAST™ B1/B2, Bio-Rad) po dobu 45-70 minut při napětí 6 V·cm⁻¹ gelu (zdroj ENDURO™, Bio-Rad; Power Station 300, Labnet International). Gel jsem fotografoval na UV transluminátoru Electronic Dual light™ (Ultra Lum).

Příprava vzorku na sekvenaci DNA

Připravené klony jsem před použitím ověřoval pomocí sekvenace DNA. Nejprve jsem připravil PCR produkt stejným postupem jako při ověřování vložení konstruktů pomocí PCR.

PCR produkty jsem přesrážel ethanolem, vysušil a rozpustil v demi H₂O. Kvalitu připravené DNA jsem kontroloval elektroforetickou analýzou DNA a spektrofotometricky (NANODROP 1000, Thermo Scientific).

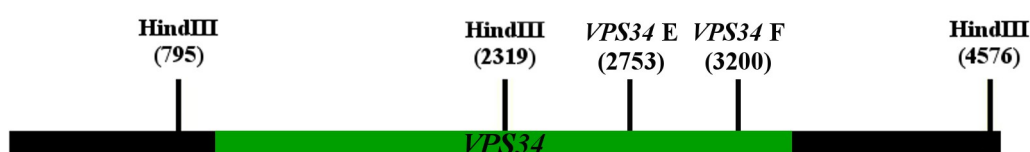
Samotnou sekvenaci vzorků prováděla Laboratoř sekvenace DNA, PřF UK. Celkový objem jedné reakce byl 8 μ l - 1 μ l primeru (5 pmol/ μ l), PCR produkt (5-10 ng na 100 bp produktu) a demi H₂O doplněná do celkového objemu 8 μ l sekvenačního vzorku.

Výstup ze sekvenace jsem kontroloval v programu BioEdit 7.2.5.

4.2.5 Southern blot a hybridizace

Restrikční analýza DNA

Pomocí programu Sequence Manipulation Suite: Restriction Digest jsem vyhledal v sekvenci *VPS34* (+/- 1 kbp) místa rozpoznávaná restrikčními endonukleázami. S ohledem na počet restrikčních míst v sekvenci, velikost vzniklých fragmentů a dostupnost enzymu jsem zvolil enzym Hind III. Po úplném štěpení by měly vznikat 2 vnitřní fragmenty o velikosti 1524 bp a 2257 bp. Se sondou připravenou s použitím primerů *VPS34* E a *VPS34* F může hybridizovat pouze fragment o velikosti 2257 bp.



Obr. 4.5: Restrikční místa rozpoznávaná enzymem HindIII v sekvenci *VPS34* (+/- 1 kbp)

VPS34 E a *VPS34* F jsou primery použité pro přípravu komplementární sondy pro hybridizaci. Zeleně je vyznačena kódující sekvence *VPS34*.

Připravil jsem směs pro štěpení našeho vzorku (celkový objemu 40 μ l, viz níže), promíchal ji a nechal štěpit při 37 °C přes noc. Vzorky jsem poté uchovával v -20 °C.

- 20 μ l genomové DNA
- 4 μ l restrikční endonukleázy Hind III (10 U/ml)
- 4 μ l 10 \times enzymového pufru
- 0,4 μ l 100 \times BSA
- X μ l demi H₂O (doplněno do objemu 40 μ l)

Southern blot s alkalickým přenosem

Genomovou DNA vyizolovanou zymolýzovou metodou jsem štěpil restrikční endonukleázou a následně analyzoval pomocí Southern blotu a hybridizace s radioaktivně značenou sondou.

20 \times SSPE (pH = 7,4) - pH upraveno 10M NaOH

0,3M NaCl

23mM NaH₂PO₄

3,2mM EDTA (pH = 8)

50 \times TAE

0,2M Tris

63mM kyseliny mléčné

0,1M EDTA (pH = 8)

Denaturační roztok

0,4M NaOH

Roztok pro depurinaci

2% (v/v) HCl

Neutralizační pufr

2× SSPE

0,2M Tris (pH = 7,5)

Vzorky po restrikci jsem rozdělil elektroforeticky v 0,8% agarózovém gelu s 1x TAE v elektroforetické aparatuře (OWL EASYCAST™ B1/B2, Bio-Rad) při konstantním napětí $4 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ po dobu 3 hodin a poté 15 minut při konstantním napětí $5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ (zdroj ENDURO™, Bio-Rad; Power Station 300, Labnet International).

Po skončení elektroforézy jsem gel zdokumentoval na UV transluminátoru Electronic Dual light™ (Ultra Lum) a následně 15 minut depurinoval promýváním ve 2% (v/v) HCl. Poté jsem DNA denaturoval promýváním gelu 15 minut v 0,4M NaOH.

Do velké skleněné Petriho misky naplněné 0,4M NaOH jsem umístil dnem vzhůru vaničku pro agarózový gel, na ni 2 pruhy filtračního papíru Whatman (delší než vanička, aby mohly nasávat kapalinu) a na ně agarózový gel, jamkami dolů. Na gel jsem umístil membránu Hybond N+ (GE Biosciences), kterou jsem předem inkuboval v 0,4M NaOH. Na ni jsem položil 2 filtrační papíry Whatman, cca 3 cm vysokou vrstvu filtračních papírů a nakonec přibližně 10 cm vrstvu buničiny. Jednotlivé vrstvy (s výjimkou vrchních filtračních papírů a buničiny) jsem předem namáčel v 0,4M NaOH, abych omezil vznik vzduchových bublin. Přenos jsem nechal probíhat přes noc.

Po přenosu jsem membránu neutralizoval promýváním v neutralizačním pufru po dobu 15 minut, vysušil ji a kroslinkoval UV zářením – 1200 μJ (UV Stratalinker 1800, Stratagene).

Příprava radioaktivně značené DNA sondy

Pro přípravu radioaktivně značené sondy jsem použil kit DECAprime™ II (Ambion). Templátovou DNA (70-100 ng, PCR produkt vnitřního úseku sledovaného genu) jsem rozpustil ve 13 μl demi H_2O a přidal k ní 2,5 μl Decamer sol. 10×. Směs jsem denaturoval 5 minut při 95 °C a okamžitě zchladil v kapalném dusíku. Tuto směs jsem poté přidal k 5 μl reakčního pufru bez CTP, 2,5 μl radioaktivně značeného CTP (specifická aktivita $>111 \text{ TBq (3000Ci)/mmol}$), 3 μl demi H_2O a 1 μl Klenowova fragmentu (5 U/ μl) a inkuboval 2-3 hodiny při 37°C.

Polymerační reakci jsem poté zastavil přidáním 3 μl 0,5M EDTA a 40 μl demi H_2O .

Nezpolymerované nukleotidy jsem odstranil pomocí kolonky (NucAway™ Spin Columns, Invitrogen) podle pokynů výrobce, s rozdílem, že jsem značenou DNA eluoval 3× 60 µl demi H₂O .

Hybridizace sondy s membránou po Southern blotu

Prehybridizační a hybridizační pufr

1,5× SSPE
10% PEG 8000
7% (w/v) SDS

Promývací roztok

1× SSPE
1% (w/v) SDS

Membránu s přenesenou DNA po kroslinkování jsem vložil do hybridizačního válce (Labnet), přidal 20 ml prehybrizačního pufru (předehřátého na 65 °C) a inkuboval v hybridizačním inkubátoru (Labnet ProBlot) při 65 °C po dobu 2 hodin. Poté jsem prehybridizační pufr odstranil, přidal 20 ml hybridizačního pufru s radioaktivně značenou sondou, kterou jsem předem denaturoval (5 minut při 100 °C), a hybridizoval jsem při 65 °C O. N..

Druhý den jsem hybridizační pufr se sondou slil do centrifugační zkumavky a uschoval při -20 °C. Do hybridizačního válce jsem přidal 50 ml promývacího roztoku a promýval při 65 °C 30 minut. Tento krok jsem opakoval celkem čtyřikrát. Následně jsem membránu vložil do kazety s filmem a exponoval při -80 °C podle potřeby (v řádu dní).

4.2.6 Northern blot a hybridizace

Pro izolaci celkové RNA jsem používal dvě alternativní metody.

Izolace RNA směsí fenol:chloroform:isoamylalkohol

Lyzační pufr

0.2M Tris-HCl (pH = 7.6)
0.5M NaCl
10mM EDTA (pH = 8)
1% (w/v) SDS

fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1)

Buněčnou kulturu jsem kultivoval submerzně v 15 ml YD na třepačce 18 hodin při 28 °C. Druhý den jsem ji centrifugoval 5 minut při 3 000g (centrifuga Hettich Universal 320 R, Hettich

Zentrifugen) při laboratorní teplotě, odstranil supernatant, promyl 20 ml demi H₂O a znovu centrifugoval za stejných podmínek. Poté jsem odstranil supernatant a sediment jsem resuspendoval v lyzačním pufru (na cca 150 mg kultury 400 µl lyzačního pufru), přidal přibližně 400 µl skleněných kuliček a 350 µl směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1) a promíchal (Vortex Genie 2, Scientific Industries). Vzorky jsem inkuboval 15 minut při 65 °C, poté promíchal 2 minuty a následně inkuboval ve vodní lázni (Barnstead International, Lab-Line) při 65 °C 15 minut a znovu 1 minutu promíchal.

Vzorky jsem centrifugoval 4 minuty při 16 000g při laboratorní teplotě (centrifuga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen), odebral supernatant a přidal k němu 2,3 násobek objemu 96% (v/v) ethanolu, promíchal a centrifugoval 4 minuty při 16 000g. Supernatant jsem odstranil a sediment jsem promyl 80% (v/v) ethanolu a znovu centrifugoval za stejných podmínek. Po centrifugaci jsem odstranil supernatant, vysušil sediment a rozpustil jej v demi H₂O při 56 °C. Vzorky RNA jsem skladoval při -20 °C. Kvalitu vyizolované RNA jsem ověřil spektrofotometricky (NANODROP 1000, Thermo Scientific) a elektroforetickou analýzou RNA.

Izolace RNA horkým fenolem

TES pufr

10mM Tris (pH = 7,5)

10mM EDTA (pH = 8)

0,5% (w/v) SDS

Fenol:chloroform (5:1)

Přibližně 100 mg biomasy (po odebrání zamražené v tekutém dusíku) jsem resuspendoval v 800 µl TES pufru, rozdělil na 2 paralely a ke každé přidal cca 200 µl skleněných kuliček a 400 µl fenol-chloroformu. Směs jsem inkuboval ve vodní lázni (Barnstead International, Lab-Line) při 65 °C 30 minut, přičemž jsem ji každých 5 minut 30 s promíchal (Vortex Genie 2, Scientific Industries). Poté jsem směs inkuboval při -80 °C po dobu 30 minut.

Následně jsem směs centrifugoval 15 minut při 20 000g při laboratorní teplotě (centrifuga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Po centrifugaci jsem odebral supernatant, přidal k němu 400 µl fenol-chloroformu, promíchal a centrifugoval 15 minut při 20 000g při laboratorní teplotě. Tento krok jsem dvakrát opakoval. Poté jsem odebral supernatant, přidal k němu 300 µl chloroformu, třikrát 20 s promíchal a poté centrifugoval 15 minut při 20 000g při laboratorní teplotě.

Odebral jsem supernatant, přidal k němu 1/10 objemu 3M NaAc a 2 objemy 96% (v/v)

ethanolu a nechal srážet nejméně 1 hodinu při -20 °C. Poté jsem směs centrifugoval 30 minut při 20 000g při 4 °C. Supernatant jsem odstranil a sediment jsem promyl 80% (v/v) ethanolem a znovu centrifugoval za stejných podmínek. Po centrifugaci jsem odstranil supernatant, vysušil sediment a rozpustil jej ve 30-40 µl demi H₂O. Kvalitu vyizolované RNA jsem ověřil spektrofotometricky (NANODROP 1000, Thermo Scientific) a elektroforetickou analýzou RNA.

Northern blot

1× TBE pufr (komerční)

0,2M Tris
10mM EDTA (pH = 8)
0,45M kyselina boritá

2× nanášecí pufr

66,6% formamid
23,4% formaldehyd
1,4× MOPS (pH = 7)
0,36mM BFM
0,13mM ethidium bromid
0,1mM EDTA

5× SSC

0,75M NaCl
85mM C₆H₅Na₃O₇·2H₂O

Z izolované RNA jsem připravil vzorky pro Northern blot – pro celkový objem vzorku 20 µl jsem použil 25 µg RNA, 10 µl 2x nanášecí pufr a doplnil do 20 µl demi H₂O. Vzorky jsem denaturoval (10 minut při 65 °C; MiniCycler™, MJ Research) a poté je inkuboval na ledu až do nanesení na 1,5% agarózový gel (agaróza v kvalitě pro RNA) s 1x TBE. Elektroforéza probíhala v elektroforetické aparatuře (OWL EASYCAST™ B1/B2, Bio-Rad) při konstantním napětí 5 V·cm⁻¹ po dobu 90 minut (zdroj ENDURO™, Bio-Rad; Power Station 300, Labnet International). Po skončení elektroforézy jsem gel zdokumentoval na UV transluminátoru Electronic Dual light™ (Ultra Lum) s různou dobou expozice. Jako standard jsem použil 1kb RNA Ladder (Norgen).

Do velké skleněné Petriho misky naplněné 5× SSC + 10mM NaOH jsem umístil dnem vzhůru vaničku pro agarózový gel, na ni 2 pruhy filtračního papíru Whatman (delší než vanička, aby mohly nasávat kapalinu) a na ně agarózový gel, jamkami dolů. Na gel jsem umístil membránu Hybond N+ (GE Biosciences), kterou jsem předem inkuboval v 5× SSC. Na ni jsem položil 2 filtrační papíry Whatman, cca 3 cm vysokou vrstvu filtračních papírů a nakonec přibližně 10 cm vrstvu buničiny. Jednotlivé vrstvy (s výjimkou vrchních filtračních papírů

a buničiny) jsem předem namáčel v $5\times$ SSC + 10mM NaOH, abych omezil vznik vzduchových bublin. Přenos jsem nechali probíhat O. N..

Po přenosu jsem membránu neutralizoval položením na filtrační papír navlhčený v 1M NH_4Ac po dobu 5 minut, poté 5 minut inkuboval na filtračním papíru navlhčeném v $5\times$ SSC a vlhkou membránu jsem kroslinkoval UV zářením (1200 μJ , UV Stratalinker 1800, Stratagene).

Hybridizace sondy s membránou po Northern blotu

0,5M fosfátový pufr

0,235M Na_2HPO_4

0,265M NaH_2PO_4

Prehybridizační pufr

0,45M fosfátový pufr

1% (w/v) BSA

1mM EDTA (pH = 8)

7% (w/v) SDS

Promývací roztok W1

0,5% (w/v) BSA

40mM fosfátový pufr

1mM EDTA (pH = 8)

5% (w/v) SDS

Promývací roztok W2

80mM fosfátový pufr

1mM EDTA (pH = 8)

1% (w/v) SDS

Membránu s přenesenou RNA po kroslinkování jsem vložil do hybridizačního válce (Labnet), přidal 20 ml prehybridizačního pufru (předehřátého na 65 °C) a inkuboval v hybridizačním inkubátoru (Labnet ProBlot) při 65 °C po dobu 2 hodin. Poté jsem přidal radioaktivně značenou DNA sondu (viz Southern blot), kterou jsem teplotně denaturoval (5 minut při 100 °C) a inkuboval s membránou při 65 °C přes noc.

Druhý den jsem hybridizační pufr se sondou slil do centrifugační zkumavky a uschoval v -20 °C. Do hybridizačního válce jsem přidal 50 ml promývacího roztoku W1 a promýval při 65 °C 10 minut. Poté jsem roztok odstranil, přidal 50 ml promývacího roztoku W1 a znovu promýval 10 minut při 65 °C. Po odstranění promývacího roztoku W1 jsem tento postup dvakrát opakoval s promývacím roztokem W2. Následně jsem membránu vložil do kazety s filmem a exponoval při -80 °C podle potřeby (v řádu hodin až dní).

4.2.7 Western blot a imunodetekce

Odběr biomasy pro izolaci proteinů

Přibližně 200-300 mg biomasy kultivované submerzně nebo na pevném médiu jsem odebral do předvážené zkumavky, okamžitě zamrazil v tekutém dusíku a zpracoval, případně uchovával při -80 °C.

Příprava buněčného lyzátu

MES pufr + inhibitory proteáz

10mM	MES (pH = 6,8)
1/100	2× koncentrovaného PIC
8mM	DTT
4mM	PMSF
2mM	AEBSF
0,5% (v/v)	NP40

K vzorkům biomasy uloženým na ledu jsem přidal 400 µl MES pufru s inhibitory proteáz na 100 mg biomasy, resuspendoval je a přenesl do mikrozkuvek se skleněnými kuličkami. Buňky jsem rozbíjel mechanicky pomocí desintegrátoru FASTPREP – 5×20 s s dvouminutovými přestávkami na ledu. Po promíchání jsem odebral supernatant do nových mikrozkuvek, přidal ½ původního objemu MES pufru ke kuličkám, promíchal a odebral supernatant. Odebraný lyzát jsem centrifugoval 5 minut při 4 °C a 1000g (centrifuga Hettich Universal 320 R, Hettich Zentrifugen). Poté jsem odebral supernatant a centrifugoval jej 5 minut při 3000g a 4 °C. Výsledný supernatant jsem rozdělil na alikvóty a změřil koncentraci proteinů.

Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové

Vzorek proteinů (10 µl 10× ředěného lyzátu) jsem smíchal se 790 µl demi H₂O a 200 µl reagens Bradfordové. Duplikáty vzorku jsem inkuboval 10 minut při laboratorní teplotě a následně měřil jejich absorbanci na spektrofotometru (Novaspec Plus, Amersham Biosciences) při vlnové délce 595 nm. Jako blank jsem použil 10 µl 10× ředěného MES pufru se 790 µl demi H₂O a 200 µl reagens Bradfordové. Jako standard jsem použil 10 µl BSA (výsledná koncentrace 5 µg/ml) se 790 µl demi H₂O a 200 µl reagens Bradfordové.

SDS-PAGE

30% (w/v) polyakrylamid

29% (w/v)	akrylamid
1% (w/v)	N, N'-methylen-bis-akrylamid

Separační pufr (pH = 8,8)

1,5M Tris
0,4% (w/v) SDS
pH upraveno 1M HCl

Zaostřovací pufr (pH = 6,8)

0,5M Tris
0,4% (w/v) SDS
pH upraveno 1M HCl

SDS elektrodoový pufr

0,05M Tris (pH = 8,3)
0,384M glycín
0,1% (w/v) SDS

Výše uvedené roztoky jsem uchovával při 4 °C.

vzorkový denaturační pufr

2,5M Tris (pH = 6,8)
50% (w/v) glycerol
0,02% (w/v) BFM
10% (w/v) SDS

Vzorkový pufr jsem uchovával při -20 °C.

Příprava 9% separačního gelu (pro 2 gely)

3,6 ml 30% akrylamidu
3 ml separačního pufru (pH = 8,8)
5,4 ml demi H₂O
30 µl 10% persíran amonný
24 µl TEMED

Příprava zaostřovacího gelu (pro 2 gely)

0,78 ml 30% akrylamidu
1,5 ml zaostřovacího pufru (pH = 6,8)
3,66 ml demi H₂O
30 µl 10% persíran amonný
24 µl TEMED

Po přidání persíranu amonného a TEMEDu jsem roztok pro separační či zaostřovací gel promíchal a ihned přenesl mezi skla. Roztok 10% persíranu amonného jsem připravil před použitím vždy nový.

Proteiny jsem analyzoval pomocí vertikální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v denaturačním prostředí SDS (SDS-PAGE).

Skla jsem očistil lihem a zafixoval v upínači skel v nalévacím stojanu (Bio-Rad). Mezi skla jsem přidal 5 ml roztoku separačního gelu a převrstvil je 200 µl izopropanolu. Po zpolymerování jsem gel odmyl od izopropanolu demi H₂O, kterou jsem poté odsál filtračním papírem. Poté jsem nanesl roztok zaostřovacího gelu a zasunul do něj hřeben. Po zpolymerování

jsem hřeben vytáhl, skla s polyakrylamidovým gelem jsem vložil do elektroforetické aparatury (Bio-Rad) a naplnil aparaturu i jamky SDS elektrodoým pufrem o teplotě 4 °C. Vzorky (5-30 µg proteinů, 1/5 objemu vzorkového pufru, 1/10 objemu 0,4M DTT a MES pufr s inhibitory) jsem inkuboval 5 minut při 95 °C. Po ochlazení jsem nanesl vzorky na gel. Použil jsem proteinový standard PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo scientific).

Aparaturu jsem připojil ke zdroji stejnosměrného proudu (ENDURO™, Labnet International) s konstantním proudem 50 mA a napětím 250 V (pro 2 gely). Elektroforéza probíhala 50-60 minut.

Western blot

Western blot pufr

25mM	Tris
0,192M	glycin
10% (v/v)	methanol

Barvicí roztok

40% (v/v)	methanol
10% (v/v)	kyselina octová
0,1% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R250

Před použitím jsem roztok přefiltroval.

Odbarvovací roztok

40% (v/v)	methanol
10% (v/v)	kyselina octová

PVDF membránu (Immobilon-P, Millipore) jsem aktivoval 5 minut v methanolu, poté 5 minut promýval v demi H₂O a následně 15 minut ve Western blot pufru. Na držáku (Bio-Rad) jsem umístil „kobereček“, na něj 2 filtrační papíry Whatman, polyakrylamidový gel, PVDF membránu, 2 filtrační papíry Whatman a „kobereček“. Každou vrstvu jsem předem namočil ve Western blot pufru, abych minimalizoval riziko vzniku vzduchových bublin. Tuto sestavu jsem vložil do aparatury naplněné Western blot pufrem a připojil ji ke zdroji stejnosměrného napětí (ENDURO™, Labnet International) při konstantním napětí 120 V a proudu 250 mA po dobu 90 minut (pro dva gely). Celou aparaturu jsem ochlazoval ledem. Po přenosu jsem z membrány odstříhl proteinový standard, vložil membránu na 20-30 s do barvicího roztoku a poté jsem membránu propláchl v odbarvovacím roztoku. Po oschnutí jsem membránu vyfotil spolu s proteinovým standardem.

Imunodetekce

PBS (pH = 7,4)

10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0,15 M NaCl

pH jsem upravil pomocí 0,2 M H_3PO_4 (s výjimkou PBS s 1% kaseinem).

GFP (B-2) HRP, myší monoklonální protilátka IgG_{2a}, 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology)

Membránu odbarvenou methanolem jsem nejprve proplachoval 5 minut v demi H_2O , poté 5 minut v PBS (pH = 7,4) a následně ji blokoval 20-30 minut v PBS s 1% kaseinem. Po blokování jsem membránu omyl 5 minut v PBS (pH = 7,4) a inkuboval 1 hodinu s anti-GFP protilátkou naředěnou 1:15000 v PBS s 1% kaseinem a Tweenem 20 (v poměru 1:4000). Po inkubaci jsem membránu promýval v PBS s Tweenem 20 (v poměru 1:4000) dvakrát po dobu 5 minut, třetí odmývání bylo v PBS bez Tweenu 20. Pro detekci jsem použil Femto substrát (SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific), se kterým jsem membránu inkuboval 5 minut. Membránu jsem vložil do kazety s filmem a exponoval při pokojové teplotě podle potřeby (v řádu vteřin až minut).

4.2.8 Charakterizace připravených kmenů

Morfologie kolonií

U připravených kmenů jsem sledoval morfologii monokolonií, případně makrokolonií. Pro sledování morfologie monokolonií jsem na vhodné médium (YD, YD + 0,02% DMSO, GM, GM + 0,05mM Se a EM) vysel buněčnou suspenzi s hustotou zvolenou tak, aby na každé misce narostlo přibližně 50-60 kolonií.

Pro sledování morfologie makrokolonií jsem nakapával 10 µl buněčné suspenze (12 mg biomasy narostlé O. N. jsem resuspendoval v 1 ml destilované H_2O). Vzdálenost mezi jednotlivými kapkami byla 1,5 cm.

Morfologii kmenů jsem sledoval v čase – v případě monokolonií obvykle 3., 5., 7. a 10. den růstu, v případě makrokolonií 3., 5., 7. a 10., 15., 20., 25. a 30. den růstu a zaznamenával pomocí kamery (JENOPTIK Progres® MF^{cool}, objektiv Cosmimar, osvětlení Kaiser RS1; binokulární lupa Leica MZ 16 F).

Zarůstání kolonií do média

Barvicí roztok

10% (v/v) methanol
2,5% (v/v) kyselina octová
0,025% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250

Schopnost připravených kvasinkových kmenů zarůstat do média (agaru) jsem testoval pomocí metody „modré stopy“. Monokolonie jsem z povrchu média odstranil špachtlí a misky opláchl destilovanou vodou. Poté jsem přidal barvicí roztok, aby byla pokryta celá plocha misky a nechal inkubovat na třepačce O. N.. Druhý den jsem odstranil zbytky barvicího roztoku a vzniklé modré stopy jsem vyfotografoval.

Mikroskopické analýzy

U připravených kmenů jsem pomocí mikroskopu sledoval, zda ve srovnání s rodičovskými kmeny dochází ke změnám na buněčné úrovni (velikost a tvar buněk, počet vakuol a váčků, lokalizace fluorescenčně značených proteinů). Preparáty jsem pozoroval pomocí Nomarského kontrastu (viditelné světlo) a v případě analýzy buněk s fluorescenčně značenými proteiny následně s filtrem pro fluorescenci GFP (filtr 513852, excitační filtr 470/40) bez Nomarského kontrastu při zvětšení 1 000×. Záznam jsem pořizoval kamerou JENOPTIK Progres® Mf^{cool}.

Kapkový test

Odolnost vůči inhibitorům jsem u připravených a rodičovských kmenů testoval pomocí nakapávání na misky s médiem obsahujícím inhibitory (kvasničný autolýzát od výrobce AES Laboratoire), případně kultivací za různých teplot. Sledoval jsem schopnost růstu testovaných kmenů v jednotlivých kapkách s různými koncentracemi buněk.

Při testování kmenů schopných aerobní respirace jsem odebíral výchozí biomasu z monokolonií kultivovaných na GM při 28 °C (připravené i rodičovské kmeny). Při testování kmenů neschopných respirace jsem odebíral výchozí biomasu z dvoudenního roztěru kultivovaného na YD při 28 °C. Z odebrané biomasy ($2 \cdot 10^8$ buněk/ml) jsem vytvořil ředící řadu a na misky nakapával 6 kapek (každá o objemu 5 μ l) tak, aby koncentrace buněk v kapce klesala od 10^6 po 10^1 . Schopnost růstu jednotlivých kmenů jsem dokumentoval 3., 5. a 7. den kultivace.

Sledování změn pH kultivačního média při vývoji makrokolonií

V průběhu vývoje makrokolonií kvasinky *S. cerevisiae* dochází v důsledku produkce

amoniaku k alkalizaci okolního média (*Palková et al., 1997*). Změny pH kultivačního média jsem sledoval pomocí indikátoru pH – 0,01% (w/v) bromkresolpurpur (BKP).

Na misky s GM + BKP jsem nakapával 6 kapek – každá po 10 μ l buněčné suspenze (12 mg biomasy narostlé O. N. jsem resuspendoval v 1 ml destilované H₂O). Vzdálenost mezi jednotlivými kapkami byla 1,5 cm. Vývoj pH média jsem zaznamenával kamerou JENOPTIK Progres® Mf^{cool}.

Analýza vertikální diferenciace centrální části makrokolonií

Makrokolonie laboratorního kmene BY4742 v průběhu růstu diferencují na dvě základní buněčné populace – horní buňky (vrchní část kolonie) a spodní buňky (buňky v blízkosti média), které se od sebe významně liší svojí morfologií i fyziologií. Tato diferenciace je dokončena kolem 10. dne kultivace (*Čáp et al., 2012*).

Makrokolonie kmene BY4742 a BY4742 *TEFVPS34* jsem kultivoval na GM + 0,01% BKP. Po vstupu do 2. alkalické fáze (11. den kultivace) jsem skalpelem vyřízl krajní kolonii, zalil ji 3% agarózou a nechal utuhnout. Poté jsem žiletkou makrokolonii vertikálně rozpůlil a upravil do podoby bločku. Z tohoto bločku jsem následně pomocí mikrotomu (Leica VT1200S) připravil řezy o tloušťce 30 μ m. Pod mikroskopem jsem nejprve ověřil, že kolonie je diferenciována na 2 vrstvy (zvětšení 400 \times). Centrální část kolonie jsem sledoval s použitím Nomarského kontrastu při zvětšení 1 000 \times .

Růstová analýza

Kultivací v tekutém médiu jsem testoval růstovou rychlost připravených kmenů ve srovnání s rodičem (za neselektivních podmínek i v přítomnosti inhibitorů) měřením OD submerzní kultury. Konkrétní podmínky kultivace jsou uvedeny u daných měření.

Při kultivaci na pevném médiu jsem sledoval plochu kolonie (mm²) na neselektivním médiu (GM, YD, EM) u připravených kmenů ve srovnání s rodičem 5. a 7. den kultivace při 28 °C. Záznam jsem pořizoval kamerou JENOPTIK Progres® Mf^{cool} a snímky analyzoval pomocí programu Colony Counter.

Spektrofluorometrické stanovení intenzity fluorescence

Intenzitu fluorescence buněk u kmenů produkujících protein fúzovaný s GFP (Flo11p-GFP a Vps34p-GFP) jsem měřil pomocí spektrofluorometru FluoroMax-P (Horiba Jobin Yvon). Externí sondou jsem sledoval intenzitu fluorescence středu monokolonií *in situ* za neselektivních

podmínek, obvykle 5. nebo 7. den. Od každého kmene jsem měřil 10 kolonií nejméně ze 3 různých misek. GFP jsem excitoval světlem s $\lambda = 475$ nm, emisní spektrum jsem zjišťoval v rozsahu $\lambda = 500-530$ nm.

Pro odečet pozadí (autofluorescence a fluorescence média) jsem použil neznačený rodičovský kmen, jehož intenzitu fluorescence jsem odečetl od naměřené intenzity fluorescence značeného kmene.

4.2.9 Software a databáze

- BioEdit (verze 7.2.5)
- BioGRID (verze 3.2.105 a 3.4.126, <http://thebiogrid.org/>, *Chatr-Aryamontri et al., 2013*)
- ClustalW2 (standardní nastavení; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>; *Larkin et al., 2007*)
- Clone Manager 3.11 (Scientific and Educational Software)
- Colony Counter (verze 29.10.2012, *Schier a Kovář, 2011*)
- ImageJ
- I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>; *Yang et al., 2015*)

Program pro homologní modelování slouží ke konstrukci modelu terciární struktury proteinu na základě jeho aminokyselinové sekvence a známých terciárních struktur jeho sekvenčních homologů (strukturních templátů). Sekvenci Vps34p *S. cerevisiae* kmene S288C jsem získal z SGD. Použil jsem doporučené nastavení, abych výběrem konkrétního templátu nevnášel chybu způsobenou např. nedostatečným pokrytím sekvence modelovaného proteinu, nízkou sekvenční identitou nebo špatným rozlišením templátu. Vytvořený model terciární struktury Vps34p má C skóre = -1,14 a přibližné TM-skóre = 0.57 ± 0.15 . C skóre (z angl. *confidence*) slouží k určení kvality predikovaného modelu. Obvykle je v rozsahu -5 až +2, čím vyšší je C skóre, tím je model přesnější. TM skóre (angl. *template modeling*) ukazuje míru podobnosti mezi templátem a predikovanou strukturou. Jeho rozsah je 0 až 1, hodnoty $>0,5$ značí správnou topologii.

Program I-TASSER je podle výsledků experimentů CASP (angl. *The Critical Assessment of protein Structure Prediction*) v současnosti nejlepším online dostupným programem pro predikci struktury proteinů (<http://predictioncenter.org/>).

- OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>)
- PyMOL 1.3
- *Saccharomyces* Genome Database (SGD, <http://www.yeastgenome.org/>, *Cherry et al., 2012*)

- Sequence Manipulation Suite (verze 2, <http://www.bioinformatics.org/sms2/>; *Stothard, 2000*)
- The GO Term Finder (verze 0.83, standardní nastavení; www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder.pl)

Tento algoritmus jsem použil pro přiřazení genů (respektive jejich produktů) k buněčným procesům. Hodnota P určuje pravděpodobnost, že by takového výsledku bylo dosaženo náhodně. Protože některé procesy zahrnují některé další procesy, ale ve výstupu jsou zobrazeny všechny, snažil jsem se vybrat hlavně ty „nadřazené“, s nižší hodnotou P. V nastavení algoritmu jsem zvolil přiřazování procesů a dále ponechal doporučené nastavení (prohledávání všech databází, jako limitní hodnotu P jsem zvolil hodnotu $<0,01$). Srovnáním frekvence zastoupení genů spojených s daným procesem oproti zastoupení genů spojených s tímto procesem v rámci genomu *S. cerevisiae* jsem určil obohacení těchto genů v testovaném souboru.

- The Yeast Transcription Factor Specificity Compendium (verze 1.02; <http://yetfasco.ccbr.utoronto.ca/>, *de Boer a Hughes, 2012*)

Abych dosáhl co nejvěrohodnějších výsledků, použil jsem sadu vazebných motivů TF, které byly ověřeny expertem (Expert Curated – no dubious set, 249 motivů) s minimem maximálního skóre nastaveným na 80 % a s přednastaveným procentuálním zastoupením A/T párů.

- UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>, *The UniProt Consortium, 2014*)
- Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking (<http://www.yeasttract.com/>, *Teixeira et al., 2014*)

5 Výsledky a diskuze

Pro větší přehlednost a srozumitelnost textu, jsem spojil části Výsledky a Diskuze do jednoho oddílu. Diskuze výsledků bioinformatických analýz tedy následuje ihned za výsledky, nikoliv ve společné diskuzi s experimentálními výsledky. Stejně tak je tomu v případě diskuze experimentálních výsledků.

5.1 Bioinformatické analýzy

5.1.1 Analýza genů interagujících s genem *VPS34* u *Saccharomyces cerevisiae*

Cíl: Ze seznamu známých (experimentálně ověřených) genetických interakcí mezi genem *VPS34* a dalšími geny odvodit buněčné procesy, do kterých může být Vps34p zapojen.

Fenotypový projev delece *VPS34* u *S. cerevisiae* je velmi rozmanitý. Dowell a kolektiv zjistili, že delece *VPS34* je u kmene $\Sigma 1278b$ letální, zatímco u kmene S288C je deleční kmen životaschopný. Prokázali tak, že podmíněná esencialita genů je způsobena celkovým genetickým pozadím daného kmene zahrnujícím velké množství genetických interakcí (Dowell *et al.*, 2010). Zajímavé je, že kmen $\Sigma 1278b$ byl připraven nezávisle ve dvou různých laboratořích – v laboratoři G. Finka a v laboratoři J. Heitmana. Přestože byl tento kmen vytvořen ze stejného rodičovského kmene, kmeny $\Sigma 1278b$ z obou laboratoří se chovají mírně odlišně (Reynolds, T., *osobní sdělení*). Tomu odpovídá výsledek práce Sarode a kolektivu, kteří připravili kmen $\Sigma 1278b$ *vps34Δ* (Sarode *et al.*, 2011). Ačkoliv výše uvedené informace dokazují, že záleží na komplexním genetickém pozadí, zajímalo mne, jakou roli v růstu a životaschopnosti buněk se změnou exprese *VPS34* hrají jednoduché genetické interakce mezi dvěma geny, tedy *VPS34* a druhým genem.

Prohledal jsem seznam 39 genů, jejichž exprese vede ke změně fenotypu delece *VPS34* uvedený v databázi BioGRID (Chatr-Aryamontri *et al.*, 2013), a tyto geny jsem anotoval podle *Saccharomyces* Genome Database – SGD (Cherry *et al.*, 2012) a UniProtKB (The UniProt Consortium, 2014) – viz Tab. 5.1 (aktuální k datu 30. 4. 2015).

Pomocí algoritmu The GO Term Finder (Cherry *et al.*, 2012) (viz kapitola 4.2.9) jsem je rozdělil do 8 základních skupin podle zapojení do společného procesu:

- 1) organizace organel (30 genů, obohacení $3,81\times$, $P = 1,54 \cdot 10^{-11}$)
- 2) metabolismus dusíku (29 genů, obohacení $2,54\times$, $P = 2,95 \cdot 10^{-6}$)

- 3) buněčná odpověď na stres (23 genů, obohacení $7,11\times$, $P = 4,66\cdot 10^{-13}$)
- 4) buněčný cyklus (21 genů, obohacení $6,11\times$, $P = 3,00\cdot 10^{-10}$)
- 5) buněčná odpověď na poškození DNA (20 genů, obohacení $12,21\times$, $P = 1,82\cdot 10^{-15}$)
- 6) organizace chromozomů (20 genů, obohacení $7,43\times$, $P = 3,45\cdot 10^{-11}$)
- 7) udržování telomer (8 genů, obohacení $18,64\times$, $P = 2,19\cdot 10^{-6}$)
- 8) replikace DNA (8 genů, obohacení $9,71\times$, $P = 5,3\cdot 10^{-4}$)

Po tomto rozdělení zůstaly 2 nezařazené geny: *SAC1* a *VMA2*. Čtyři geny lze zařadit pouze do jediné skupiny (*GET1*, *SNC1*, *SNC2* a *VMA1*), ostatní geny spadají do více skupin, z toho 2 geny – *BRE1* a *ELG1* do všech 8.

Manuálním procházením anotací jednotlivých genů jsem zjistil, že přiřazení genů do jednotlivých skupin, na základě zapojení jejich produktů do společného buněčného procesu algoritmem The GO Term Finder, není kompletní. Proto jsem u těchto genů doplnil číslo daného procesu a vyznačil jej žlutou barvou (viz Tab. 5.1). Počty zapojených genů se změnily u procesů 4, 5, 7 a 8. Do buněčného cyklu je zapojeno 24 genů, do buněčné odpovědi na poškození DNA 23 genů, do udržování telomer 10 genů a do replikace DNA 13 genů.

Nejčastějším typem genetické interakce mezi *VPS34* a jiným genem je syntetický růstový defekt (22 genů). Druhým hlavním typem genetické interakce mezi *VPS34* a jiným genem je syntetická letalita (15 genů). Genetické interakce typu potlačení fenotypu či záchrana koncentrací (angl. *Dosage rescue*) jsou pouze u 2 genů interagujících s *VPS34* (viz Tab. 5.1). Produkty 9 z 15 genů, jejichž současná delece s *VPS34* je synteticky letální, jsou zapojeny do organizace organel a metabolismu dusíku. Druhým nejčastějším procesem u těchto genů je buněčný cyklus (8 z 15 genů).

Tab. 5.1: Seznam experimentálně ověřených genetických interakcí mezi *VPS34* a dalšími geny

Název genu	Typ interakce*	Funkce genu	Buněčný proces**
ASF1	Syntetická letalita	Kóduje chaperon pro histony – hraje roli při jejich skládání, výměně a odstraňování při skládání a rozpadu nukleozomů (chromatinu) během replikace, transkripce, umlčování chromatinu a opravách DNA. Asf1p interaguje s Rad53p.	1, 2, 3, 5, 6, 8
BRE1	Syntetická letalita	Kóduje E3 ubiquitinligázu, která monoubiquitinyluje histon H2B, což vede k aktivaci transkripce, prodlužování transkriptu RNA polymerázou II, sestřihu pre-mRNA, umlčování telomer a metylaci histonu H3. Bre1p také reguluje tvorbu dvouvláknových zlomů v průběhu meiózy a je spojen s kontrolním bodem poškození DNA.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
CSM1	Syntetická letalita	Kóduje nukleolární protein, který zajišťuje orientaci a správnou segregaci homologních chromozomů během meiózy. Csm1p je rovněž zapojen do replikace DNA a segregace rDNA repetice.	1, 2, 4, 6, 8
CTF8	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein nezbytný pro kohezi sesterských chromatid v průběhu mitózy, rovněž je zapojený do regulace replikace DNA. Vytváří komplex s Ctf18p.	1, 2, 4, 6, 8
CTF18	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein nezbytný pro kohezi sesterských chromatid v průběhu mitózy, rovněž je zapojený do regulace replikace DNA. Ctf18p má zřejmě některé funkce společné s Rad24p a podílí se na reparaci DNA. Tvoří komplex s Ctf8p.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8
DCC1	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein nezbytný pro kohezi sesterských chromatid v průběhu mitózy, rovněž je zapojený do udržování délky telomer, regulace replikace a reparace DNA. Tvoří komplex s Ctf8p a Ctf18p.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
ELG1	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein nezbytný pro kohezi sesterských chromatid v průběhu mitózy, rovněž je zapojený do udržování délky a umlčování telomer, regulace replikace, rekombinace a reparace DNA. Elg1p interaguje s Rad27p. Spolu s Ctf18p a Rad24p reguluje aktivitu Rad53p.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
EPL1	Syntetická letalita	Kóduje protein, který je součástí histon acetyltransferázového komplexu NuA4, který acetylací histonů H2A a H4 aktivuje transkripci genů. Epl1p je zapojen do umlčování chromatinu, reparace DNA, regulace buněčného cyklu či makroautofágie.	1, 2, 3, 4, 5, 6
GET1	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein, který je nezbytný pro posttranslační cílení proteinů do endoplazmatického retikula (ER) a pro správnou distribuci a morfologii mitochondrií.	1
GET2	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein, který je nezbytný pro posttranslační cílení proteinů do ER. Rovněž je zapojen do reparace a replikace DNA.	1, 5, 8
HDA1	Syntetická letalita	Kóduje histon deacetylázu, která se podílí na umlčování telomer. Rovněž je zapojena do buněčné odpovědi na teplotní šok a do rezistence vůči azolu.	1, 2, 6
LGE1	Syntetická letalita	Kóduje protein neznámé funkce. Zřejmě hraje roli v rezistenci vůči léčivům, umlčování telomer a v regulaci buněčného cyklu.	1, 2, 4, 6, 8
LRS4	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein, který se podílí na orientaci a rozchodu chromozomů v průběhu 1. meiotického dělení. Rovněž je zapojen do umlčování rDNA.	1, 2, 4, 6
LTE1	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein, který je zapojen do regulace buněčného cyklu a do vnitrobuněčného transportu.	1, 4, 6

MRE11	Syntetický růstový defekt	Kóduje nukleázu, která je jako součást komplexu MRX (složeného z Mre11p, Rad50p a Xrs2p) zapojen do reparace DNA, zvláště do oprav dvouvláknových zlomů DNA.	1, 2, 3, 4, 5
PEP7	Potlačení fenotypu	Kóduje protein zapojený do vnitrobuněčného transportu a do cílení proteinů do vakuoly. Rovněž hraje roli při segregaci vakuol mezi mateřskou a dceřinou buňkou při buněčném dělení.	1, 4
POL32	Syntetický růstový defekt	Kóduje DNA polymerázu III, která hraje roli při replikaci chromozomální DNA a reparaci DNA.	2, 3, 5, 8
RAD27	Syntetický růstový defekt	Kóduje DNA nukleázu zapojenou do replikace a reparace jaderné a mitochondriální DNA.	1, 2, 3, 5, 6, 8
RAD50	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein, který je jako součást komplexu MRX (složeného z Mre11p, Rad50p a Xrs2p) zapojen do reparace DNA (zvláště do oprav dvouvláknových zlomů DNA) a udržování délky telomer.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
RAD51	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein zapojený do reparace DNA (zvláště do oprav dvouvláknových zlomů DNA). Interaguje s Rad52p. Rad51p je paralog Rad55p a Rad57p.	1, 2, 4, 5, 6, 7
RAD52	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein zapojený do reparace DNA (zvláště do oprav dvouvláknových zlomů DNA). Aktivuje protein Rad51p.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
RAD53	Syntetická letalita	Kóduje proteinkinázu, která zastavuje buněčný cyklus, pokud je DNA poškozená.	2, 3, 4, 5, 8
RAD54	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein zapojený do remodelace chromatinu a reparace DNA (zvláště do oprav dvouvláknových zlomů DNA). Interaguje s Rad51p.	1, 2, 3, 5, 6, 7
RAD55	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein zapojený do reparace DNA (zvláště do oprav dvouvláknových zlomů DNA). Vytváří dimer s Rad57p, který aktivuje Rad51p. Rad55p je fosforylován Rad53p. Rad55p je paralog Rad51p a Rad57p.	1, 2, 3, 4, 5
RAD57	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein zapojený do reparace DNA (zvláště do oprav dvouvláknových zlomů DNA). Vytváří dimer s Rad55p, který aktivuje Rad51p. Rad57p je paralog Rad51p a Rad55p.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
RPN4	Syntetický růstový defekt	Kóduje transkripční faktor, který aktivuje transkripci genů pro proteazomy. Je nezbytný pro růst při nízkých teplotách a hraje roli při reparaci DNA.	2, 3, 5
SAC1	Syntetická letalita	Kóduje fosfoinositidfosfatázu, která je zapojena do regulace sekreční dráhy, transportu proteinů, regulace syntézy sfingolipidů a udržování buněčné stěny.	-
SIC1	Syntetická letalita	Kóduje inhibitor cyklin-dependentní kinázy Cdc28p, který reguluje buněčný cyklus a hraje roli v udržování integrity genomu. Rovněž negativně ovlivňuje autofagii.	3, 4
SLA2	Syntetická letalita	Kóduje protein, který je nezbytný pro výběr místa pučení, organizaci aktinového cytoskeletu, lokalizaci H ⁺ ATPáz na plazmatickou membránu a hraje roli při endocytóze, exocytóze a uspořádávání buněčné stěny.	1, 4
SLX4	Syntetický růstový defekt	Kóduje DNA endonukleázu zapojenou do replikace a reparace DNA (zvláště do oprav dvouvláknových zlomů DNA).	2, 3, 5, 8
SNCI	Syntetická letalita	Kóduje protein typu v-SNARE nezbytný pro transport mezi Golgiho aparátem a cytoplazmatickou membránou. Paralog Snc2p.	1

SNC2	Syntetická letalita	Kóduje protein typu v-SNARE nezbytný pro vezikulární transport mezi Golgiho aparátem a plazmatickou membránou. Paralog Snc1p.	1
SRS2	Syntetický růstový defekt	Kóduje DNA helikázu zapojenou do reparace DNA (zvláště do oprav dvouvláknových zlomů DNA) a regulace buněčného cyklu. Interaguje s Rad51p.	1, 2, 3, 4, 5, 6
TOR1	Syntetický růstový defekt	Kóduje proteinkinázu s homologií k PI3K, která reguluje buněčný růst podle podmínek prostředí (dostupnost živin a stres). Negativně reguluje makroautofagii a je zapojena do reparace DNA. Paralog Tor2p.	1, 2, 3, 4, 5
TSA1	Syntetická letalita	Kóduje thioredoxin peroxidázu, která hraje roli při skládání proteinů, ochraně DNA před poškozením, v buněčné odpovědi na oxidativní stres a v udržování délky telomer. Paralog Tsa2p.	2, 3, 4, 5, 7
VMA1	Syntetická letalita	Kóduje podjednotku vakuolární H ⁺ ATPázy, která se podílí na acidifikaci vakuoly a může hrát roli v homeostázi vápenatých iontů v buňce.	2
VMA2	Syntetická letalita	Kóduje podjednotku vakuolární H ⁺ ATPázy, která se podílí na acidifikaci vakuoly a homeostázi vápenatých iontů v buňce.	-
VPS15	Záchrana koncentrací	Kóduje proteinkinázu nezbytnou pro cílení proteinů do vakuoly. Vytváří komplex s Vps34p, který navádí na membránu Golgiho aparátu. Hraje roli při makroautofagii, elongaci RNA polymerázou II a retrográdním transportu.	1, 2, 3
XRS2	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein, který je jako součást komplexu MRX (složeného z Mre11p, Rad50p a Xrs2p) zapojen do reparace DNA, zvláště do oprav dvouvláknových zlomů DNA a udržování délky telomer.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

* Typ interakce: Syntetická letalita – mutace či delece jednoho nebo druhého genu nevede k významné změně fenotypu, současné odstranění obou genů je pro buňku letální. Syntetický růstový defekt – mutace či delece jednoho nebo druhého genu nevede k významné změně fenotypu, současné odstranění obou genů vede k významným růstovým problémům. Potlačení fenotypu – v tomto případě vede zvýšená exprese *VPS34* k potlačení defektu v lokalizaci proteinů způsobeného delecí *PEP7*. Záchrana koncentrací (angl. *Dosage rescue*) – v tomto případě vede zvýšená exprese *VPS34* k potlačení letality u kmene s mutovanou kinázovou doménou Vps15p.

** Buněčný proces, do kterého je daný gen, respektive jeho produkt, zapojen podle algoritmu The GO Term Finder (viz výše).

Zeleně jsou označeny geny, které interagují s *VPS34*, ale ne s *VPS15* (viz kapitola 5.1.2). Žlutou barvou jsou vyznačeny buněčné procesy, do kterých je zapojen produkt daného genu na základě anotace jeho funkce, ale nebyl tam zařazen podle algoritmu The GO Term Finder.

5.1.2 Analýza genů interagujících s genem *VPS15* u *Saccharomyces cerevisiae*

Cíl: Ze seznamu známých (experimentálně ověřených) genetických interakcí mezi genem *VPS15* a dalšími geny odvodit buněčné procesy, do kterých může být Vps15p zapojen a porovnat tyto výsledky s výsledky analýzy genů interagujících s genem *VPS34*.

Prohledal jsem seznam 21 genů, jejichž exprese vede ke změně fenotypu delece *VPS15*, uvedený v databázi BioGRID (*Chatr-Aryamontri et al., 2013*), a tyto geny jsem anotoval podle *Saccharomyces* Genome Database – SGD (*Cherry et al., 2012*) a UniProtKB (*The UniProt Consortium, 2014*) (aktuální k datu 30. 4. 2015) – viz Tab. 5.2. Pomocí algoritmu The GO Term Finder (*Cherry et al., 2012*) jsem je poté rozdělil do 7 základních skupin podle zapojení do společného procesu:

- 1) organizace organel (20 genů, obohacení $4,71\times$, $P = 4,59 \cdot 10^{-11}$)
- 2) metabolismus dusíku (15 genů, obohacení $2,63\times$, $P = 0,00664$)
- 3) organizace chromozomů (12 genů, obohacení $8,28\times$, $P = 3,84 \cdot 10^{-7}$)
- 4) buněčný cyklus (11 genů, obohacení $5,95\times$, $P = 8,18 \cdot 10^{-5}$)
- 5) buněčná odpověď na poškození DNA (10 genů, obohacení $11,33\times$, $P = 7,16 \cdot 10^{-7}$)
- 6) buněčná odpověď na stres (10 genů, obohacení $5,73\times$, $P = 0,00053$)
- 7) udržování telomer (7 genů, obohacení $30,27\times$, $P = 2,68 \cdot 10^{-7}$)

Pouze jediný gen (*GET1*) je zapojen jen do jediného buněčného procesu, všechny ostatní lze zařadit do více skupin, z toho 4 geny (*BRE1*, *RAD50*, *RAD52* a *XRS2*) do všech 7.

Podobně jako u *VPS34*, také v případě *VPS15* není přiřazení genů do jednotlivých skupin, na základě zapojení jejich produktů do společného buněčného procesu (pomocí algoritmu The GO Term Finder), kompletní. Proto jsem u těchto genů na základě manuálního procházení jejich anotací doplnil číslo daného procesu a vyznačil jej žlutou barvou (viz Tab. 5.2). Počty zapojených genů se změnily u procesů 3, 4 a 5. Do organizace chromozomů je zapojeno 14 genů, do buněčného cyklu 15 genů a do buněčné odpovědi na poškození DNA 12 genů.

Nejčastějším typem genetické interakce mezi *VPS15* a jiným genem je syntetický růstový defekt (11 genů). Druhým hlavním typem genetické interakce mezi *VPS15* a jiným genem je syntetická letalita (7 genů). Genetické interakce typu zesílení fenotypu či záchrana koncentrací jsou pouze u 3 genů interagujících s *VPS15* (viz Tab. 5.2). Produkty 6 ze 7 genů, jejichž současná delece s *VPS15* je synteticky letální, jsou zapojeny do organizace organel.

Tab. 5.2: Seznam experimentálně ověřených genetických interakcí mezi *VPS15* a dalšími geny

Název genu	Typ interakce*	Funkce genu	Buněčný proces**
ACS2	Syntetická letalita	Kóduje acetyl-koenzym A syntetázu zapojenou do acetylace histonů. Acs2p je nezbytný pro růst na fermentovatelných zdrojích uhlíku.	1, 3
BRE1	Syntetický růstový defekt	Kóduje E3 ubiquitinligázu, která monoubiquitinyluje histon H2B, což vede k aktivaci transkripce, prodlužování transkriptu RNA polymerázou II, sestřihu pre-mRNA, umlčování telomer a methylaci histonu H3. Bre1p také reguluje tvorbu dvouvláknových zlomů v průběhu meiózy a je spojen s kontrolním bodem poškození DNA.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
EPL1	Syntetická letalita	Kóduje protein, který je součástí histon acetyltransferázového komplexu NuA4, který acetylací histonů H2A a H4 aktivuje transkripci genů. Epl1p je zapojen do umlčování chromatinu, reparace DNA, regulace buněčného cyklu či makroautofágie.	1, 2, 3, 4, 5, 6
GET1	Syntetická letalita	Kóduje protein, který je nezbytný pro posttranslační cílení proteinů do endoplazmatického retikula (ER), udržování proteinů ER v ER a pro správnou distribuci a morfologii mitochondrií.	1
GET2	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein, který je nezbytný pro posttranslační cílení proteinů do endoplazmatického retikula (ER), udržování proteinů ER v ER. Rovněž je zapojen do reparace a replikace DNA.	1, 5
LGE1	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein neznámé funkce. Zřejmě hraje roli v rezistenci vůči léčivům, umlčování telomer a v regulaci buněčného cyklu.	1, 2, 3, 4
LTE1	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein, který je zapojen do regulace buněčného cyklu a do vnitrobuněčného transportu.	1, 3, 4
MRE11	Syntetický růstový defekt	Kóduje nukleázu, která je jako součást komplexu MRX (složeného z Mre11p, Rad50p a Xrs2p) zapojen do reparace DNA, zvláště do oprav dvouvláknových zlomů DNA.	1, 2, 4, 5, 6
NAT3	Syntetická letalita	Kóduje enzym s N-koncovou acetyltransferázovou aktivitou zodpovědný za acetylaci N-koncového methioninu u přibližně 15 % proteinů. Hraje roli v organizaci cytoskeletu a při dělení mitochondrií mezi mateřskou a dceřinou buňkou.	1, 4
PAP2	Syntetická letalita	Kóduje poly(A) RNA polymerázu, která hraje roli v degradaci RNA, dělení buněčného jádra, udržování integrity genomu, reparaci DNA, kondenzaci chromozomů a v kohezi sesterských chromatid.	1, 2, 3, 4, 5, 6
RAD50	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein, který je jako součást komplexu MRX (složeného z Mre11p, Rad50p a Xrs2p) zapojen do reparace DNA (zvláště do oprav dvouvláknových zlomů DNA) a udržování délky telomer.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
RAD51	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein zapojený do reparace DNA (zvláště do oprav dvouvláknových zlomů DNA). Interaguje s Rad52p. Rad51p je paralog Rad55p a Rad57p.	1, 2, 3, 4, 5, 7
RAD52	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein zapojený do reparace DNA (zvláště do oprav dvouvláknových zlomů DNA). Aktivuje protein Rad51p.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
RIF2	Zesílení fenotypu	Kóduje protein zapojený do kontroly délky telomer a jejich umlčování. Paralog Orc4p.	1, 2, 3, 7

<i>SLA2</i>	Syntetická letalita	Kóduje protein, který je nezbytný pro výběr místa pučení, organizaci aktinového cytoskeletu, lokalizaci H ⁺ ATPáz na plazmatickou membránu a hraje roli při endocytóze, exocytóze a uspořádávání buněčné stěny.	1, 4
<i>SRS2</i>	Syntetický růstový defekt	Kóduje DNA helicázu zapojenou do reparace DNA (zvláště do oprav dvouvláknových zlomů DNA) a regulace buněčného cyklu. Interaguje s Rad51p.	1, 2, 3, 4, 5, 6
<i>TAF1</i>	Syntetická letalita	Kóduje histon acetyltransferázu, která je součástí komplexu obecných transkripčních faktorů TFIID a podílí se tak na regulaci transkripce genů přepisovaných RNA polymerázou II.	2, 3
<i>TEL1</i>	Zesílení fenotypu	Kóduje proteinkinázu s homologií k PI3K, která hraje roli v udržování délky telomer a při reparaci DNA. Reguluje průchod buněčným cyklem v závislosti na přítomnosti poškozené DNA. Fosforyluje Mre11p a Xrs2p.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
<i>TOR1</i>	Syntetický růstový defekt	Kóduje proteinkinázu s homologií k PI3K, která reguluje buněčný růst podle podmínek prostředí (dostupnost živin a stres). Negativně reguluje makroautofagii a je zapojena do reparace DNA. Paralog Tor2p.	1, 2, 4, 5, 6
<i>VPS34</i>	Záchrana koncentrací	Kóduje PtdIns-3-kinázu s proteinkinázovou aktivitou. Hraje roli v transportu proteinů, autofagii a pozitivní regulaci elongace transkripce genů přepisovaných RNA polymerázou II. Zapojen do udržování integrity buněčné stěny.	1, 2
<i>XRS2</i>	Syntetický růstový defekt	Kóduje protein, který je jako součást komplexu MRX (složeného z Mre11p, Rad50p a Xrs2p) zapojen do reparace DNA, zvláště do oprav dvouvláknových zlomů DNA a udržování délky telomer.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

* Typ interakce: Syntetická letalita – mutace či delece jednoho nebo druhého genu nevede k významné změně fenotypu, současné odstranění obou genů je pro buňku letální. Syntetický růstový defekt – mutace či delece jednoho nebo druhého genu nevede k významné změně fenotypu, současné odstranění obou genů vede k významným růstovým problémům. Zesílení fenotypu – mutace nebo zvýšená exprese genu způsobí zesílení fenotypu spojeného s mutací či zvýšenou expresí druhého genu. Záchrana koncentrací (angl. *Dosage rescue*) – v tomto případě vede zvýšená exprese *VPS34* k potlačení letality u kmene s mutovanou kinázovou doménou Vps15p.

** Buněčný proces, do kterého je daný gen, respektive jeho produkt, zapojen podle algoritmu The GO Term Finder (viz výše).

Zeleně jsou označeny geny, které interagují s *VPS15*, ale ne s *VPS34* (viz kapitola 5.1.1). Žlutou barvou jsou vyznačeny buněčné procesy, do kterých je zapojen produkt daného genu na základě anotace jeho funkce, ale nebyl tam zařazen podle algoritmu The GO Term Finder.

5.1.3 Analýza promotoru genu *VPS34* u *Saccharomyces cerevisiae*

Cíl: Z predikovaných a známých (experimentálně ověřených) transkripčních faktorů regulujících expresi *VPS34* odvodit buněčné procesy, do kterých může být Vps34p zapojen.

K nalezení potenciálních vazebných míst pro transkripční faktory (TF) jsem analyzoval sekvenci promotoru *VPS34 in silico*. Zvolil jsem sekvenci 1000 bp proti směru od iniciačního kodónu a prohledal ji pomocí databáze YeTFaSCo – viz kapitola 4.2.9 (*de Boer a Hughes, 2012*). Sekvence promotoru *VPS34* patřící referenčnímu kmeni *Saccharomyces cerevisiae* S288C byla získána z SGD (*Cherry et al., 2012*). Anotovaná data jsou uvedena v Tab. 5.3.

Pro přesnější predikci regulace transkripce *VPS34* jsem výsledky získané z databáze YeTFaSCo porovnal se seznamem potenciálních TF s vazebnými místy v promotoru *VPS34* uvedeným v databázi YEASTRACT (*Teixeira et al., 2014*), viz Tab. 5.3.

Seznam TF, u nichž bylo experimentálně prokázáno, že regulují expresi *VPS34* (podle databáze YEASTRACT), je uveden v Tab. 5.3.

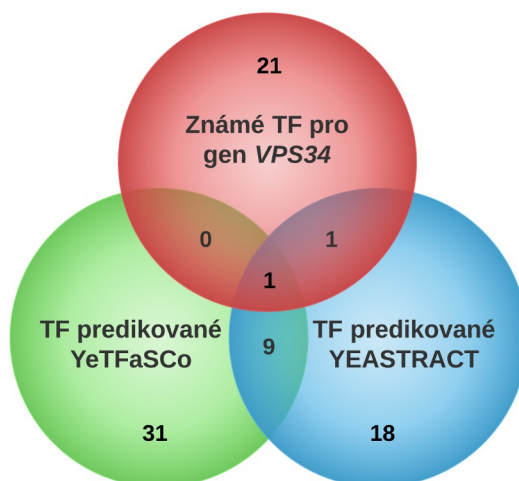
Anotace TF uvedených v Tab. 5.3 a 5.4 jsou převzaty z databází SGD (*Cherry et al., 2012*) a UniProtKB (*The UniProt Consortium, 2014*) (aktuální k datu 30. 4. 2015), případně je uvedena citace článku, který rozšiřuje anotace uvedené v těchto databázích. Transkripční faktory v Tab. 5.3 jsou seřazeny podle počtu predikovaných vazebných míst, v Tab. 5.4 abecedně.

Analýzou promotoru *VPS34* pomocí databází YeTFaSCo a YEASTRACT jsem identifikoval celkem 81 TF (viz Obr. 5.1). Regulace transkripce *VPS34* byla experimentálně potvrzena u 23 TF, vazba zbývajících 58 TF na promotor *VPS34* byla predikována na základě jejich známých vazebných motivů. Pouze jeden TF byl shodně predikován oběma databázemi a byl i ověřen experimentálně – Ash1p. Druhým případem shody predikce s empirickými daty je Tec1p – TF, který byl predikován databází YEASTRACT, ne však YeTFaSCo. Dalších 9 TF (Bas1p, Com2p, Crz1p, Gcr1p, Gis1p, Gln3p, Hsf1p, Msn2p a Msn4p) bylo predikováno oběma databázemi.

Pomocí algoritmu The GO Term Finder (*Cherry et al., 2012*) jsem těchto 81 TF rozdělil do 9 základních skupin podle zapojení do společného procesu:

- 1) metabolismus dusíku (72 TF, obohacení $3,03\times$, $P = 1,13\cdot 10^{-26}$)
- 2) buněčná odpověď na chemický podnět (28 TF, obohacení $7,69\times$, $P = 1,77\cdot 10^{-15}$)
- 3) odpověď na stres (25 TF, obohacení $3,40\times$, $P = 1,24\cdot 10^{-5}$)
- 4) organizace chromozomů (20 TF, obohacení $3,60\times$, $P = 0,00019$)

- 5) odpověď na dostupnost živin (16 TF, obohacení $9,43\times$, $P = 4,61 \cdot 10^{-9}$)
- 6) filamentární růst (12 TF, obohacení $8,22\times$, $P = 7,61 \cdot 10^{-6}$)
- 7) buněčná odpověď na lipidy (4 TF, obohacení $49,00\times$, $P = 3,99 \cdot 10^{-5}$)
- 8) buněčná odpověď na sloučeniny arsenu (4 TF, obohacení $49,00\times$, $P = 0,00027$)
- 9) regulace transkripce genů pro ribosomální proteiny (4 TF, obohacení $49,00\times$, $P = 0,00161$)



Obr. 5.1: Počty TF regulujících transkripci *VPS34* a jejich zastoupení v jednotlivých databázích.
Grafické znázornění počtů experimentálně ověřených a predikovaných TF a shody mezi jednotlivými databázemi.

Manuálním procházením anotací jednotlivých TF jsem určil další 2 buněčné procesy, do kterých je zapojen větší počet TF: 10) buněčný cyklus (15 TF) a 11) reparace DNA (9 TF).

Také v tomto případě není přiřazení TF do jednotlivých skupin, na základě zapojení do společného buněčného procesu (pomocí algoritmu The GO Term Finder), kompletní. Proto jsem u těchto TF na základě manuálního procházení jejich anotací doplnil číslo daného procesu a vyznačil jej žlutou barvou (viz Tab. 5.3 a 5.4). Počty zapojených TF se změnily u procesů 3 a 6. Do odpovědi na stres je zapojeno 28 TF a do filamentárního růstu 14 TF. Kromě toho je zde dalších 24 TF, které jsou možná přímo nebo nepřímo zapojeny do filamentárního růstu – jejich exprese má vliv na invazivní či pseudohyfální růst (u těchto jsem číslo procesu vyznačil červenou barvou).

Po tomto rozdělení zůstaly 2 nezařazené TF: Ykl222cp a Yll054cp, jejichž společným rysem je, že jejich funkce jako TF v buňce nebyla zatím experimentálně prokázána.

Tab. 5.3: Seznam predikovaných transkripčních faktorů s vazebnými místy v promotoru genu *VPS34*

Název transkripčního faktoru	Počet potenciálních vazebných míst*	Funkce transkripčního faktoru	Buněčný proces**	Predikováno databází
Gln3p	8/1	Aktivátor transkripce genů, které jsou regulovány katabolickou represí dusíku, pokud je místo glutaminu zdrojem dusíku kyselina glutamová. Delece vede k absenci pseudohyfálního a invazivního růstu a ke snížení filamentárního růstu. Zvýšená exprese vede k nárůstu filamentárního a invazivního růstu.	1, 2, 5, 6	YeTFaSCo YEASTRACT
Mot3p	7	Represor transkripce genů pro hypoxii při aerobních podmínkách (spolu s Rox1p). Reprimuje transkripci genů pro biosyntézu ergosterolu v odpovědi na hyperosmotický stres a genů indukovaných feromonem. Může fungovat také jako aktivátor transkripce. Delece vede ke snížení či zvýšení filamentárního růstu a ke snížení invazivního růstu. Zvýšená exprese vede ke snížení filamentárního růstu a k absenci či zvýšení invazivního růstu.	1, 3, 6	YEASTRACT
Msn1p	5	Aktivátor transkripce genů pro degradaci škrobu a sacharózy, genů pro příjem železa a akumulaci chromu. Aktivuje transkripci genů odpovědi na teplotní šok, methylglyoxal a osmotický stres. Pozitivně reguluje pseudohyfální růst a invazivní růst při hladovění na glukózu. Delece vede ke snížení filamentárního, k absenci invazivního a k nárůstu pseudohyfálního růstu. Zvýšená exprese vede k nárůstu pseudohyfálního a invazivního růstu.	1, 2, 3, 6	YeTFaSCo
Ash1p	4/4	Součást histon deacetylázového komplexu. Represor transkripce genů pro přepínání párovacího typu a genů pro přechod z G1 do S fáze mitotického buněčného cyklu. Aktivátor transkripce genů pro pseudohyfální růst, např. genu <i>FLO11</i> . Delece vede ke snížení filamentárního růstu.	1, 6, 10	YeTFaSCo YEASTRACT
Gcr1p	1/4	Aktivátor transkripce genů pro glykolýzu a ribozomální proteiny.	1, 2, 4, 5, 9	YeTFaSCo YEASTRACT
Hsf1p	3/4	Aktivátor transkripce genů odpovědi na teplotní stres, hladovění na glukózu, zvýšené pH, oxidativní stres či hromadění kyseliny salicylové. Negativně reguluje TOR dráhu. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 3, 6	YeTFaSCo YEASTRACT
Mot2p	3	Jako součást proteinového subkomplexu NOT negativně reguluje bazální i aktivovanou transkripci. V proteinovém komplexu CCR4-NOT reguluje transkripci pozitivně.	1	YeTFaSCo
Nrg1p	3	Represor transkripce genů při glukózové represí, genů buněčné odpovědi na hyperosmotické prostředí, vysoké pH a genů pro invazivní růst při limitaci glukózou. Je spojen s pseudohyfálním růstem. Paralog Nrg2p.	1, 2, 3, 5, 6	YEASTRACT
Otu1p	3	Regulátor transkripce s nejasnou funkcí. Možná nepřímo reguluje transkripci genu <i>PIS1</i> , který kóduje enzym fosfatidylinositol syntázu. Zvýšená exprese genu <i>PIS1</i> vede k nárůstu invazivního růstu.	1	YeTFaSCo
Rox1p	3	Represor transkripce genů aktivovaných hypoxií. Hraje roli v odolnosti buňky proti hyperosmotickému stresu.	1, 3	YeTFaSCo
Stb5p	3	Regulátor transkripce genů v odpovědi na oxidativní stres a genů mnohočetné lékové rezistence. Interaguje s Pdr1p.	1, 2, 3	YeTFaSCo
Gcn4p	2	Aktivátor transkripce genů pro biosyntézu aminokyselin a purinů při hladovění na aminokyseliny či puriny. Represor transkripce genů pro ribozomální proteiny při limitaci živinami. Regulátor exprese genů pro tvorbu organel,	1, 2, 3, 5, 6, 9	YEASTRACT

		buněčných odpovědí na různé stresy, homeostázi glykogenu a autofágii. Zvýšená exprese vede k nárůstu filamentárního růstu.		
Gts1p	2	Regulátor transkripce genů spojených s teplotní odolností a flokulací. Podílí se na sporulaci, endocytóze a na načasování pučení v závislosti na velikosti buňky. Negativně reguluje biosyntetickou dráhu fosfatidylinositolu. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 6, 10	YeTFaSCo
Msn2p	2/1	Aktivátor transkripce genů odpovědí na nízké a vysoké pH, hypotonické prostředí, zamrzání, nízkou a vysokou teplotu, arzen, ethanol, H ₂ O ₂ , zvýšený obsah solí, hydrostatický tlak, hromadění reaktivních sloučenin dusíku, oxidativní stres, kyselinu sorbovou či hladovění na glukózu, aminokyseliny a ionty zinku. Regulátor transkripce při replikativním buněčném stárnutí v odpovědi na kalorickou restrikcii. Zapojen do buněčné odpovědi na methylrtuť. Delece vede ke snížení filamentárního růstu a k absenci invazivního růstu. Zvýšená exprese vede k nárůstu filamentárního růstu. Paralog Msn4p.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8	YeTFaSCo YEASTRACT
Pdr3p	2	Regulátor transkripce genů pro proteiny zajišťující mnohočetnou lékovou rezistenci – ABC přenašeče, proteiny biosyntetické dráhy sfingolipidů a hexóзовé přenašeče. Také je zapojen do retrográdní signalizace z mitochondrií do jádra a do regulace genů exprimovaných v odpovědi na poškození DNA. Paralog Pdr1p.	1, 2, 11	YeTFaSCo
Skn7p	2	Regulátor transkripce genů odpovědi na změny osmolarity prostředí (včetně genů kódujících proteiny zapojené do regulace integrity buněčné stěny) a genů teplotního šoku v odpovědi na oxidativní stres. Aktivátor pseudohyfálního růstu (<i>Lorenz a Heitman, 1998</i>). Delece vede ke snížení filamentárního růstu. Paralog Hms2p, jehož delece vede k nárůstu pseudohyfálního růstu a zvýšená exprese ke zvýšení invazivního růstu.	1, 2, 3, 6	YeTFaSCo
Ykl222cp	2	Předpokládaný TF s nejasnou funkcí.		YeTFaSCo
Adr1p	1	Aktivátor transkripce genů regulovaných glukózovou represí – aktivuje transkripci genů pro peroxizomální proteiny, beta-oxidaci mastných kyselin, fermentaci glukózy, využití ethanolu a glycerolu. Aktivátor transkripce genu pro alkohol dehydrogenázu II (Adh2p může stimulovat filamentární růst). Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 2, 4, 5, 6, 7	YEASTRACT
Asg1p	1	Předpokládaný TF buněčné odpovědi na stres.	3	YeTFaSCo
Azf1p	1	Aktivátor transkripce genů pro udržování integrity buněčné stěny v přítomnosti nefermentovatelného zdroje uhlíku. Aktivuje transkripci genů pro metabolismus uhlíku a buněčný růst v přítomnosti glukózy. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 2, 6	YeTFaSCo
Bas1p	1/1	Regulátor transkripce genů pro biosyntetické dráhy purinů, pyrimidinů a histidinu. Delece vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 6	YeTFaSCo YEASTRACT
Com2p	1/1	Předpokládaný TF s neznámou funkcí, možná role v adaptaci buňky na stres.	3	YeTFaSCo YEASTRACT
Crz1p	1/1	Aktivátor transkripce genů odpovědi na zvýšené pH, zvýšený obsah solí a přítomnost iontů vápníku. Aktivátor transkripce genů v závislosti na signalizaci vápníkem či feromony. Aktivátor genů pro transport iontů sodíku a genů pro regulaci koncentrace iontů draslíku. Zapojen do biosyntézy buněčné stěny.	1, 2, 3	YeTFaSCo YEASTRACT

Cup2p	1	Aktivátor transkripce genů pro metalothionein v přítomnosti iontů mědi. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu. Paralog Haa1p, jehož zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 6	YEASTRACT
Cup9p	1	Represor transkripce genů pro transport di- a oligopeptidů. Možná hraje roli v regulaci transkripce genů homeostázi mědi. Paralog Tos8p, jehož zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1	YeTFaSCo
Ecm23p	1	Represor genů pro pseudohyfální růst, může hrát roli při tvorbě a uspořádávání buněčné stěny a při úpravách pre-rRNA. Homolog Srd1p.	6	YeTFaSCo
Fhl1p	1	Regulátor exprese genů pro ribozomální proteiny.	1, 9	YeTFaSCo
Fkh1p	1	Aktivátor transkripce genů přechodu z G2 do M fáze mitotického buněčného cyklu. Represor transkripce genů přechodu z G1 do S fáze a z G2 do M fáze mitotického buněčného cyklu. Negativní regulátor pseudohyfálního růstu. Hraje roli v buněčné odpovědi na methylrtuť. Současná delece genů <i>FKH1</i> a <i>FKH2</i> vede k fenotypu podobnému pseudohyfálnímu růstu nezávislému na živinách. Paralog Fkh2p.	1, 2, 4, 6, 10	YEASTRACT
Fkh2p	1	Aktivátor transkripce genů přechodu z G2 do M fáze mitotického buněčného cyklu. Represor transkripce genů přechodu z G1 do S fáze a z G2 do M fáze mitotického buněčného cyklu. Negativní regulátor pseudohyfálního růstu. Zvýšená exprese vede ke snížení pseudohyfálního růstu. Současná delece genů <i>FKH2</i> a <i>FKH1</i> vede k fenotypu podobnému pseudohyfálnímu růstu nezávislému na živinách. Paralog Fkh1p.	1, 4, 6, 10	YEASTRACT
Gal4p	1	Aktivátor transkripce genů pro využití galaktózy v přítomnosti galaktózy. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 2, 5, 6	YEASTRACT
Gat3p	1	Transkripční faktor s neznámou funkcí, hraje roli v uspořádávání buněčné stěny spór. Delece vede k nárůstu filamentárního růstu, zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 6	YeTFaSCo
Gat4p	1	Transkripční faktor s neznámou funkcí, hraje roli v uspořádávání buněčné stěny spór. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 6	YeTFaSCo
Gis1p	1/1	Regulátor transkripce za podmínek limitace živinami a při poškození DNA. Hraje roli v regulaci biosyntézy fosfolipidů. Paralog Rph1p.	1, 3, 4, 5, 11	YeTFaSCo YEASTRACT
Hcm1p	1	Aktivátor transkripce genů pozdní G1, S a M fázi buněčného cyklu. Zapojen do udržování telomer a buněčné odpovědi na oxidativní stres.	1, 2, 3, 10	YeTFaSCo
Hmlalpha2p	1	Represor transkripce <i>a</i> specifických a haploidně specifických genů.	1, 10	YeTFaSCo
Hms1p	1	Transkripční faktor s nejasnou funkcí. Hraje roli při výstupu z mitózy. Aktivátor pseudohyfálního růstu (<i>Lorenz a Heitman, 1998</i>). Delece vede k nárůstu pseudohyfálního růstu, zvýšená exprese k nárůstu invazivního a filamentárního růstu.	6, 10	YeTFaSCo
Mal63p	1	Aktivátor transkripce genů metabolismu maltózy.	1	YEASTRACT
Matalpha2p	1	Represor transkripce <i>a</i> specifických a haploidně specifických genů.	1, 10	YeTFaSCo
Mga1p	1	Transkripční faktor podobný TF teplotního šoku. Aktivátor pseudohyfálního růstu (<i>Lorenz a Heitman, 1998</i>). Delece	6	YeTFaSCo

		vede ke snížení filamentárního a pseudohyfálního růstu, zvýšena exprese k nárůstu invazivního růstu.		
Msn4p	1/1	Aktivátor transkripce genů odpovědi na nízké a vysoké pH, hypotonické prostředí, nízkou a vysokou teplotu, zamrzání, arzen, ethanol, H ₂ O ₂ , zvýšený obsah solí, hydrostatický tlak, hromadění reaktivních sloučenin dusíku, oxidativní stres či hladovění na glukózu, aminokyseliny a ionty zinku. Regulátor transkripce při replikativním buněčném stárnutí v odpovědi na kalorickou restrikcí. Paralog Msn2p.	1, 2, 3, 4, 5, 8	YeTFaSCo YEASTRACT
Pdr8p	1	Aktivátor transkripce genů pro ABC přenašeče a další proteiny zajišťující buňce stresovou odolnost. Paralog Yrr1p, jehož zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 3	YeTFaSCo
Pho4p	1	Aktivátor transkripce genů při limitaci fosfátem.	1, 3, 4, 5	YeTFaSCo
Put3p	1	Aktivátor transkripce genů pro využití prolinu jako zdroje dusíku, pokud není přítomen jiný využitelný zdroj dusíku.	1, 4	YeTFaSCo
Rgm1p	1	Předpokládaný TF s nejasnou funkcí, zřejmě aktivátor transkripce genů pro metabolismus aldehydů a katabolismus monosacharidů. Delece vede k absenci invazivního růstu a nárůstu filamentárního růstu. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu. Paralog Usv1p.	1, 6	YeTFaSCo
Rgt1p	1	Regulátor transkripce genů pro transportéry glukózy v závislosti na dostupnosti glukózy. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu. Paralog Eds1p, jehož zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 6	YEASTRACT
Rph1p	1	Histon demethyláza, represor transkripce genu pro fotolýzu DNA (enzym odstraňující pyrimidinové dimery). Paralog Gis1p.	1, 4, 11	YEASTRACT
Rtg1p	1	Regulátor transkripce genu pro citrát syntázu (zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu), zapojen do buněčné odpovědi na kyselinu olejovou. Hraje roli v komunikaci mezi jádrem, mitochondriemi a peroxizomy. Na DNA se váže jako heterodimer s Rtg3p.	1, 2, 7	YEASTRACT
Rtg3p	1	Regulátor transkripce genu pro citrát syntázu (zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu), zapojen do buněčné odpovědi na kyselinu olejovou. Na DNA se váže jako heterodimer s Rtg1p a aktivuje retrográdní dráhu a dráhu TOR. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 2, 6, 7	YEASTRACT
Srd1p	1	Transkripční faktor neznámé funkce zapojený do úprav pre-rRNA. Homolog Ecm23p.	1	YeTFaSCo
Stp2p	1	Aktivátor transkripce genů pro permeázy aminokyselin v přítomnosti extracelulárních aminokyselin. Represor transkripce genů pod katabolickou represí dusíku a genů odpovědi na stres. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu. Paralog Stp1p.	1, 3, 6	YEASTRACT
Sum1p	1	Represor transkripce genů střední fáze sporulace v průběhu mitózy. Hraje roli v udržování délky telomer a umlčování chromatinu.	1, 10	YeTFaSCo
Sut1p	1	Aktivátor transkripce genů při hypoxii a genů pro import sterolu do buňky. Represor genů pro filamentární růst v prostředí s dostatkem živin. Zapojen do regulace konjugace spojené s buněčnou fúzí. Zvýšená exprese vede k absenci pseudohyfálního a ke snížení invazivního růstu. Paralog Sut2p.	1, 2, 3, 5, 6, 10	YeTFaSCo
Tec1p	1	Společně s proteinem Ste12p aktivuje transkripci genů pro filamentaci. Zapojen do pseudohyfálního růstu a invazivního růstu při hladovění na glukózu, aktivuje transkripci genů odpovědi na stres. Delece vede ke ztrátě	1, 3, 6	YEASTRACT

		filamentárního, pseudohyfálního i invazivního růstu. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního a filamentárního růstu.		
Tog1p	1	Aktivátor transkripce genů metabolismu mastných kyselin. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 6	YeTFaSCo
Usv1p	1	Regulátor transkripce genů pro využití nefermentovatelných zdrojů uhlíku, biosyntézu buněčné stěny a genů odpovědi na stres vyvolaný změnou koncentrace solí. Paralog Rgm1p.	1, 2, 3, 5	YeTFaSCo
Xbp1p	1	Represor transkripce genu pro cyklin (Cln1p) při stresu (zvýšená teplota, oxidativní stres či změny koncentrace solí) nebo při limitaci glukózou během mitózy či pozdní meiózy. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 2, 3, 4, 6, 10	YEASTRACT
Yap1p	1	Aktivátor transkripce genů buněčné odpovědi na oxidativní stres (někdy ve spolupráci s proteinem Skn7p) a pro redoxní homeostázi. Regulátor genů buněčné odpovědi na sloučeniny arsenu, kadmium, zvýšenou teplotu, léčiva a přítomnost iontů kovů. Zvýšená exprese vede k nárůstu filamentárního růstu. Paralog Cad1p.	1, 2, 3, 6, 8	YEASTRACT
Yap3p	1	Aktivátor transkripce genů v odpovědi na změny prostředí, např. genu <i>PDR5</i> pro ABC přenašeč mnohočetné lékové rezistence.	1	YEASTRACT
Yhp1p	1	Represor transkripce genů G1/M fáze v průběhu pozdní S fáze buněčného cyklu. Paralog Yox1p.	1, 10	YeTFaSCo
Yll054cp	1	Předpokládaný protein neznámé funkce, nutný pro využití nefermentovatelných zdrojů uhlíku. Podobnost s Pip2p, který je transkripčním aktivátorem genů pro proliferaci peroxizomů.		YeTFaSCo

* Počet potenciálních vazebných míst před lomítkem je predikován databází YeTFaSCo, za lomítkem databází YEASTRACT. Pokud lomítko není, odpovídá počet míst predikci podle uvedené databáze.

** Buněčný proces, do kterého je daný TF zapojen podle algoritmu The GO Term Finder (viz výše).

Žlutou barvou jsou vyznačeny buněčné procesy, do kterých je zapojen produkt daného genu na základě anotace jeho funkce, ale nebyl tam zařazen podle algoritmu The GO Term Finder. U transkripčních faktorů, které by mohly být přímo nebo nepřímo zapojeny do filamentárního růstu (jejich exprese má vliv na invazivní či pseudohyfální růst), jsem číslo tohoto procesu vyznačil červenou barvou.

Tab. 5.4: Seznam experimentálně prokázaných transkripčních faktorů regulujících expresi genu *VPS34* podle databáze YEASTRACT

Název transkripčního faktoru	Regulace transkripce <i>VPS34</i>	Funkce transkripčního faktoru	Buněčný proces*	Vliv na filamentární růst
Ace2p	Negativní	Aktivátor transkripce genu pro metalothionein. Represor pseudohyfálního růstu (<i>King a Butler, 1998</i>). Reguluje transkripci genů přechodu z G1 do S fáze mitotického buněčného cyklu a je nutný pro odstranění septa po cytokinezi. Paralog Swi5p, v jehož nepřítomnosti aktivuje transkripci endoglukanázy buněčné stěny.	1, 6, 10	Negativní
Arr1p	Negativní	Aktivátor transkripce genů odpovědi na přítomnost sloučenin arsenu.	1, 2, 3, 8	–
Ash1p	Pozitivní	Součást histon deacetylázového komplexu. Represor transkripce genů pro přepínání párovacího typu a genů pro přechod z G1 do S fáze mitotického buněčného cyklu. Aktivátor transkripce genů pro pseudohyfální růst, např. genu <i>FLO11</i> . Delece vede ke snížení filamentárního růstu.	1, 6, 10	Pozitivní
Cse2p	Negativní	Koaktivátorová součást mediátorového komplexu, podílí se na regulaci transkripce téměř všech genů přepisovaných RNA polymerázou II.	1	–
Cst6p	Pozitivní	Aktivátor transkripce genů regulovaných přítomností kyseliny olejové. Rovněž je důležitý pro využití alternativních zdrojů uhlíku a udržování stability chromozomů. Paralog Aca1p.	1, 2, 5, 7	–
Hap2p	Negativní	Součást proteinového komplexu Hap2p/3p/4p/5p. Reguluje transkripci genů elektrontransportního řetězce při respiračním dýchání v mitochondriích. Komplex je aktivován přítomností hemu a reprimován přítomností glukózy.	1, 2, 5	–
Hat1p	Negativní	Histon acetyltransferáza, hraje roli při umlčování telomer a opravě dvouvláknových zlomů DNA.	1, 4, 11	–
Hfi1p	Pozitivní	Součást histon acetylačních komplexů, podílí se na regulaci více než 10 % genů přepisovaných RNA polymerázou II.	1, 4	–
Ino2p	Negativní	Součást proteinového komplexu Ino2p/Ino4p. Aktivuje transkripci genů pro syntézu fosfolipidů v odpovědi na nedostatek inositolu.	1	–
Nsi1p	Negativní	Terminuje transkripci RNA polymerázou I. Zapojen do umlčování rDNA. Interaguje se Sir2p. Paralog Reb1p, jehož delece vede ke snížení filamentárního a k absenci invazivního růstu.	1, 4	–
Pgd1p	Negativní	Součást mediátorového komplexu, podílí se na regulaci transkripce téměř všech genů přepisovaných RNA polymerázou II.	1	–
Pip2p	Nelze určit**	Aktivátor transkripce genů pro proliferaci peroxizomů a pro beta-oxidaci mastných kyselin v přítomnosti kyseliny olejové. Na DNA se váže jako heterodimer Pip2p-Oaf1p, pokud jsou jediným zdrojem uhlíku mastné kyseliny; reprimován glukózou. Paralog Oaf1p.	1, 2, 5	–
Sas3p	Negativní	Histon acetyltransferáza, hraje roli v umlčování telomer.	1, 4	–
Sfp1p	Pozitivní	Aktivátor transkripce genů pro ribozomální proteiny a biogenezi ribozomů za optimální podmínek. Reguluje transkripci genů odpovědi na poškození DNA a přechodu G2/M fáze mitotického buněčného cyklu. Podílí se na regulaci velikosti buňky v závislosti na zdroji uhlíku. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 6, 9, 10, 11	Možná pozitivní

Sin3p	Pozitivní	Histon deacetyláza, reprimuje transkripci rDNA, transkripci v průběhu meiózy a reguluje transkripci genů zapojených do přechodu G2/M fáze mitotického buněčného cyklu. Brání umlčování telomer a rDNA. Aktivátor transkripce genů odpovědi na zvýšenou teplotu. Podílí se na opravách dvouřetězcových zlomů DNA přes spojování nehomologních konců, udržování délky telomer a integrity genomu. Delece vede ke zvýšené exkreci inositolu.	1, 3, 4, 10, 11	–
Sin4p	Pozitivní	Součást mediátorového komplexu, podílí se na regulaci transkripce téměř všech genů přepisovaných RNA polymerázou II. Delece vede ke snížení filamentárního růstu a k absenci invazivního růstu. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 6	Možná pozitivní
Sir2p	Negativní	Histon deacetyláza zapojená do umlčování rDNA a telomer, negativní regulace rekombinací a replikace DNA a do oprav DNA. Hraje roli v regulaci autofágie (homolog savčího proteinu Sirt1), mitofágie a stárnutí buněk. Paralog Hst1p.	1, 4, 11	–
Snf5p	Pozitivní	Součást chromatin-remodelujícího komplexu, který funguje jako obecný regulátor transkripce. Aktivuje transkripci genů metabolismu uhlíku. Zapojen do oprav dvouřetězcových zlomů DNA pomocí homologních rekombinací. Stimuluje filamentární růst při nedostatku glukózy. Paralog Sfh1p.	1, 2, 3, 4, 5, 6, 11	Pozitivní
Sok2p	Negativní	Represor přepnutí z jednobuněčného na filamentární růst. Zapojen do regulace cAMP závislé PKA signální dráhy jako regulátor exprese genů pro růst a vývoj. Delece vede k nárůstu filamentárního růstu. Paralog Phd1p, který pozitivně reguluje pseudohyální růst a reguluje expresi genu <i>FLO11</i> .	6	Negativní
Spt10p	Pozitivní	Protein s předpokládanou histon acetylázovou aktivitou. Aktivuje transkripci genů pro histony a reguluje transkripci genů pro alkohol dehydrogenázu II (Adh2p může stimulovat filamentární růst) a kyselou fosfatázu. Zapojen do oprav DNA a umlčování telomer a rDNA. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 3, 4, 6, 11	Možná pozitivní
Spt20p	Pozitivní	Součást histon acetylačních komplexů, podílí se na regulaci více než 10 % genů přepisovaných RNA polymerázou II.	1, 2, 3, 4	–
Tec1p	Pozitivní	Společně se Ste12p aktivuje transkripci genů pro filamentaci. Zapojen do pseudohyálního růstu a invazivního růstu při hladovění na glukózu, aktivuje transkripci genů odpovědi na stres. Delece vede ke ztrátě filamentárního, pseudohyálního i invazivního růstu. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního a filamentárního růstu.	1, 3, 6	Pozitivní
Tos8p	Nelze určit**	Předpokládaný transkripční faktor s nejasnou funkcí. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu. Paralog Cup9p.	6	Možná pozitivní

* Buněčný proces, do kterého je daný TF zapojen podle algoritmu The GO Term Finder, případně podle manuálního procházení anotací jednotlivých TF (viz výše).

** Použitá metoda (imunoprecipitace chromatinu spojená s DNA microarrayi, tzv. ChIP-on-chip) neumožňuje určit způsob regulace transkripce (pozitivní či negativní), pouze dokazuje vazbu TF na promotor.

Žlutou barvou jsou vyznačeny buněčné procesy, do kterých je zapojen produkt daného genu na základě anotace jeho funkce, ale nebyl tam zařazen podle algoritmu The GO Term Finder. U TF, které by mohly být přímo nebo nepřímo zapojeny do filamentárního růstu (jejich exprese má vliv na invazivní či pseudohyální růst), jsem číslo tohoto procesu vyznačil červenou barvou.

5.1.4 Analýza regulace transkripce genu *VPS15* u *Saccharomyces cerevisiae*

Cíl: Ze seznamu známých (experimentálně ověřených) transkripčních faktorů, které regulují expresi genu *VPS15* určit, do kterých procesů může být Vps15p zapojen a porovnat tyto výsledky s výsledky analýzy promotoru *VPS34*.

Proteinkináza Vps15p je nezbytná pro plnou aktivaci PI3K aktivity Vps34p (*Stack et al., 1993*). Chtěl jsem proto porovnat, zda je transkripce *VPS15* regulována stejnými TF jako exprese *VPS34*, případně TF zapojenými do stejných procesů, jaké jsem odvodil na základě analýzy promotoru *VPS34* (viz Tab. 5.3 a 5.4).

U *VPS15* jsem analyzoval pouze experimentálně ověřené TF, které regulují transkripci *VPS15* (podle databáze YEASTRACT, *Teixeira et al., 2014*), jejichž seznam je uveden v Tab. 5.5. Anotace TF jsou převzaty z databází SGD (*Cherry et al., 2012*) a UniProtKB (*The UniProt Consortium, 2014*) (aktuální k datu 30. 4. 2015), případně je uvedena citace článku, který rozšiřuje anotace uvedené v těchto databázích. Transkripční faktory jsou seřazeny abecedně.

Celkem 17 TF, u kterých bylo prokázáno, že regulují transkripci *VPS15*, jsem pomocí algoritmu The GO Term Finder (*Cherry et al., 2012*) rozdělil do 3 základních skupin podle zapojení do společného procesu:

- 1) metabolismus dusíku (16 TF, obohacení $3,21\times$, $P = 1,08\cdot 10^{-5}$)
- 2) filamentární růst (6 TF, obohacení $19,61\times$, $P = 9,14\cdot 10^{-5}$)
- 3) buněčná odpověď na sloučeniny arzenu (3 TF, obohacení $176,00\times$, $P = 0,00012$)

U pěti TF, které regulují transkripci *VPS15* bylo prokázáno, že regulují rovněž transkripci *VPS34* (Ace2p, Ash1p, Sfp1p, Sok2p a Tec1p), viz Tab. 5.4 a 5.5. Další 4 TF, které regulují transkripci *VPS15* byly predikovány jako regulátory transkripce *VPS34* (Adr1p, Mot3p, Msn2p a Msn4p), viz Tab. 5.4 a 5.5.

U Ace2p bylo experimentálně ověřeno, že negativně reguluje pseudohyfální růst (*King a Butler, 1998*), přesto nebyl do tohoto buněčného procesu (algoritmem The GO Term Finder) přiřazen. Do filamentárního růstu je tedy zapojeno 7 TF.

Tab. 5.5: Seznam experimentálně prokázaných transkripčních faktorů regulujících expresi genu *VPS15* podle databáze YEASTRACT

Název transkripčního faktoru	Regulace transkripce	Funkce transkripčního faktoru	Buněčný proces*	Vliv na filamentární růst
Abf1p	Negativní	Obecný regulační faktor, který je kromě regulace transkripce genů pro ribozomy, využívání zdrojů uhlíku a dusíku a sporulaci, zapojen do replikace DNA, remodelace a umlčování chromatinu, regulace buněčného cyklu a oprav DNA.	1	–
Ace2p	Negativní	Aktivátor transkripce genu pro metalothionein. Represor pseudohyfálního růstu (<i>King a Butler, 1998</i>). Reguluje transkripci genů přechodu z G1 do S fáze mitotického buněčného cyklu a je nutný pro odstranění septa po cytokinezi. Paralog Swi5p, v jehož nepřítomnosti aktivuje transkripci endoglukanázy buněčné stěny.	1, 2	Negativní
Adr1p	Pozitivní	Aktivátor transkripce genů regulovaných glukózovou represí – aktivuje transkripci genů pro peroxizomální proteiny, beta-oxidaci mastných kyselin, fermentaci glukózy, využití ethanolu a glycerolu. Aktivátor transkripce genu pro alkohol dehydrogenázu II (Adh2p může stimulovat filamentární růst). Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1	Možná pozitivní
Ash1p	Pozitivní	Součást histon deacetylázového komplexu. Represor transkripce genů pro přepínání párovacího typu a genů pro přechod z G1 do S fáze mitotického buněčného cyklu. Aktivátor transkripce genů pro pseudohyfální růst, např. genu <i>FLO11</i> . Delece vede ke snížení filamentárního růstu.	1, 2	Pozitivní
Leu3p	Negativní	Regulátor transkripce genů pro biosyntézu aminokyselin (leucinu) a pro asimilaci amoniaku. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1	Možná pozitivní
Mcm1p	Negativní	Regulátor transkripce genů pro párování, aktivátor transkripce genů přechodu z G2 do M fáze mitotického buněčného cyklu a genů pro biosyntézu argininu. Represor transkripce genů pro katabolismus argininu. Zapojen do iniciace replikace DNA.	1	–
Mot3p	Nelze určit**	Represor transkripce genů pro hypoxii při aerobních podmínkách (spolu s Rox1p). Reprimuje transkripci genů pro biosyntézu ergosterolu v odpovědi na hyperosmotický stres a genů indukovaných feromonem. Může fungovat také jako aktivátor transkripce. Delece vede ke snížení či zvýšení filamentárního růstu a ke snížení invazivního růstu. Zvýšená exprese vede ke snížení filamentárního růstu a k absenci či zvýšení invazivního růstu.	1	Nejasný
Msn2p	Pozitivní	Aktivátor transkripce genů odpovědi na nízké a vysoké pH, hypotonické prostředí, zamrzání, nízkou a vysokou teplotu, arzen, ethanol, H ₂ O ₂ , zvýšený obsah solí, hydrostatický tlak, hromadění reaktivních sloučenin dusíku, oxidativní stres, kyselinu sorbovou či hladovění na glukózu, aminokyseliny a ionty zinku. Regulátor transkripce při replikativním buněčném stárnutí v odpovědi na kalorickou restrikcii. Zapojen do buněčné odpovědi na methylrtuť. Delece vede ke snížení filamentárního růstu a k absenci invazivního růstu. Zvýšená exprese vede k nárůstu filamentárního růstu. Paralog Msn4p.	1, 3	Možná pozitivní
Msn4p	Pozitivní	Aktivátor transkripce genů odpovědi na nízké a vysoké pH, hypotonické prostředí, nízkou a vysokou teplotu, zamrzání, arzen, ethanol, H ₂ O ₂ , zvýšený obsah solí, hydrostatický tlak, hromadění reaktivních sloučenin dusíku,	1, 3	–

		oxidativní stres či hladovění na glukózu, aminokyseliny a ionty zinku. Regulátor transkripce při replikativním buněčném stárnutí v odpovědi na kalorickou restrikcii. Paralog Msn2p.		
Not3p	Pozitivní	Součást komplexu CCR4-NOT, který je obecným regulátorem transkripce.	1	–
Phd1p	Negativní	Aktivátor transkripce genů pro pseudohyfální růst včetně genu <i>FLO11</i> . Delece vede ke snížení filamentárního a pseudohyfálního růstu a ke ztrátě invazivního růstu. Zvýšená exprese vede k nárůstu filamentárního, invazivního a pseudohyfálního růstu. Paralog Sok2p.	1, 2	Pozitivní
Rme1p	Pozitivní	Represor transkripce genů meiotického buněčného cyklu, aktivátor transkripce genů mitotického buněčného cyklu. Aktivátor transkripce genů pro invazivní růst při limitaci glukózou. Delece vede ke snížení invazivního růstu, zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1, 2	Pozitivní
Rpn4p	Pozitivní	Aktivátor transkripce genů pro proteazomy. Reguluje transkripci genů v odpovědi na stres a v přítomnosti sloučenin arsenu. Zapojen do regulace oprav DNA.	1, 3	–
Sfp1p	Negativní	Aktivátor transkripce genů pro ribozomální proteiny a biogenezi ribozomů za optimální podmínek. Reguluje transkripci genů v odpovědi na poškození DNA a přechodu G2/M fáze mitotického buněčného cyklu. Podílí se na regulaci velikosti buňky v závislosti na zdroji uhlíku. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního růstu.	1	Možná pozitivní
Sok2p	Negativní	Represor přepnutí z jednobuněčného na filamentární růst. Zapojen do regulace cAMP závislé PKA signální dráhy jako regulátor exprese genů pro růst a vývoj. Delece vede k nárůstu filamentárního růstu. Paralog Phd1p, který pozitivně reguluje pseudohyfální růst a reguluje expresi genu <i>FLO11</i> .	2	Negativní
Ste12p	Pozitivní	Aktivátor transkripce genů pro párování kvasinek. Spolu s Tec1p také aktivuje geny pro filamentární (invazivní i pseudohyfální) růst. Delece vede ke snížení filamentárního, invazivního a ke ztrátě pseudohyfálního růstu. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního a pseudohyfálního růstu.	1, 2	Pozitivní
Tec1p	Pozitivní	Společně s proteinem Ste12p aktivuje transkripci genů pro filamentaci. Zapojen do pseudohyfálního růstu a invazivního růstu při hladovění na glukózu, aktivuje transkripci genů v odpovědi na stres. Delece vede ke ztrátě filamentárního, pseudohyfálního i invazivního růstu. Zvýšená exprese vede k nárůstu invazivního a filamentárního růstu.	1, 2	Pozitivní

* Buněčný proces, do kterého je daný TF zapojen podle algoritmu The GO Term Finder (viz výše).

** Použitá metoda (imunoprecipitace chromatinu spojená s DNA microarrayi, tzv. ChIP-on-chip) neumožňuje určit způsob regulace transkripce (pozitivní či negativní), pouze dokazuje vazbu TF na promotor.

Oranžově jsou označeny TF, které byly experimentálně potvrzeny jako regulátory transkripce *VPS34* (viz Tab. 5.4). Modře jsou označeny TF, které byly predikovány jako regulátory transkripce *VPS34* (viz Tab. 5.3).

Žlutou barvou jsou vyznačeny buněčné procesy, do kterých je zapojen produkt daného genu na základě anotace jeho funkce, ale nebyl tam zařazen podle algoritmu The GO Term Finder.

5.1.5 Diskuze bioinformatických analýz

V této kapitole shrnuji výsledky bioinformatických analýz, které interpretuji s pomocí dostupných dat a rovněž se zaměřuji na diskuzi problémů spojených s použitými analýzami.

Cílem provedených bioinformatických analýz bylo nalézt buněčné procesy, které jsou spojeny s Vps15p a Vps34p a srovnáním s publikovanými experimentálními daty určit, zda byly funkce Vps15p a Vps34p v těchto procesech popsány. Analýzou genů interagujících s *VPS15* a *VPS34* a také analýzou regulace transkripce těchto genů jsem odhalil celkem 14 buněčných procesů, ve kterých mohou Vps15p a Vps34p hrát roli (Tab. 5.6).

Tab. 5.6: Shrnutí buněčných procesů, do kterých mohou být Vps15p a Vps34p zapojeny

Buněčný proces	Geny interagující s <i>VPS15</i>	Geny interagující s <i>VPS34</i>	TF regulující expresi <i>VPS15</i>	TF regulující expresi <i>VPS34</i>
Buněčná odpověď na chemický podnět	–	–	–	✓
Buněčná odpověď na lipidy	–	–	–	✓
Buněčná odpověď na poškození DNA	✓	✓	–	✓?
Buněčná odpověď na sloučeniny arsenu	–	–	✓	✓
Buněčná odpověď na stres	✓	✓	–	✓
Buněčný cyklus	✓	✓	–	✓?
Filamentární růst	–	–	✓	✓
Metabolismus dusíku	✓	✓	✓	✓
Odpověď na dostupnost živin	–	–	–	✓
Organizace chromozomů	✓	✓	–	✓
Organizace organel	✓	✓	–	–
Regulace transkripce genů pro ribozomální proteiny	–	–	–	✓
Replikace DNA	–	✓	–	–
Udržování telomer	✓	✓	–	–

Otazník značí, že daný proces nebyl určen algoritmem The GO Term Finder, ale manuálním procházením anotací jednotlivých TF. Vytvořeno na základě výsledků bioinformatických analýz, viz kapitoly 5.1.1-4.1.4.

Pro všechny buněčné procesy odvozené z bioinformatických analýz, v nichž by měly hrát roli Vps15p nebo Vps34p, jsem našel podporu v experimentálních datech (viz kapitola 3.2.4). To naznačuje, že použité predikce byly správné. Přesto některé procesy nejsou obvykle s Vps15p a Vps34p spojovány, případně není znám přesný mechanismus jejich působení. Těmito procesy jsou zejména buněčná odpověď na poškození DNA, buněčný cyklus, filamentární růst, organizace chromozomů a replikace DNA. Nedostatek experimentálních dat je zvláště patrný u Vps15p. Přestože jeho úloha v indukci PI3K aktivity Vps34p je esenciální, řada studií je zaměřena na Vps34p bez zkoumání vlivu Vps15p na daný proces.

Buněčné procesy, do kterých může být Vps15p zapojen (celkem 9), jsou rovněž procesy, do kterých může být zapojen Vps34p. Na druhou stranu, Vps34p může hrát roli v pěti dalších procesech, se kterými Vps15p spojován není (buněčná odpověď na chemický podnět, buněčná odpověď na lipidy (zahrnuje veškeré buněčné změny v odpovědi na přítomnost lipidů), odpověď na dostupnost živin, regulace transkripce genů pro ribozomální proteiny a replikace DNA). Jedním z možných vysvětlení je, že protein Vps15p nereguluje aktivitu Vps34p během těchto procesů. Přestože je Vps15p nezbytný pro plnou aktivaci PI3K aktivity Vps34p, bazální aktivita Vps34p je na Vps15p nezávislá (*Stack et al, 1993*) a může být pro tyto procesy dostačující. Tomu, že Vps15p a Vps34p jsou zapojeny do různých procesů (případně jsou různě důležité pro tytéž procesy), nasvědčují i výsledky genetických interakcí – syntetická letalita způsobená delecí *VPS15* a dalšího genu je spojena se 7 geny, u delecce *VPS34* je to genů 15, z toho jen 3 jsou sdílené s *VPS15*. Při odstranění genů *BRE1* nebo *LGE1* u kmene s delecí *VPS15* dojde k syntetickému růstovému defektu. Pokud jsou tyto geny odstraněny u kmene s delecí *VPS34*, dojde k syntetické letalitě. A naopak delecce *GET1* se současnou delecí *VPS34* způsobí syntetický růstový defekt, u kmene s delecí *VPS15* je však synteticky letální.

Druhou možností je, že více funkcí spojených s Vps34p je dáno větším počtem dat (více interagujících genů, použití nejen experimentálně ověřených, ale i predikovaných TF pro analýzu). Podle databáze Web of ScienceTM bylo publikováno 136 článků spojených s Vps34p a pouze 38 článků o Vps15p u *S. cerevisiae* (klíčová slova *Vps34*, respektive *Vps15* a *Saccharomyces cerevisiae*, 12. 7. 2015). Pro analýzu regulace transkripce *VPS15* jsem záměrně využil jen experimentálně ověřené TF – nechtěl jsem zvyšovat počet TF predikcí, protože by tak narůstala i možná chyba. Je pravděpodobné, že s přidáním dat (predikované TF) by bylo prokázáno spojení mezi Vps15p a výše uvedenými procesy specifickými pro Vps34p.

Z Tab. 5.6 je dobře patrné, že buněčné procesy, do kterých by měl být Vps15p nebo Vps34p zapojen, se liší mezi interagujícími geny a regulací transkripce *VPS15* a *VPS34*. V případě interagujících genů lze předpokládat, že Vps15p/Vps34p interagují s produkty těchto genů. Oproti tomu v případě analýzy regulace transkripce *VPS15/VPS34* usuzujeme na zapojení jejich produktů do nalezených buněčných procesů na základě toho, že jejich exprese by měla být regulována (pozitivně či negativně) TF, které hrají v těchto procesech roli. Jediným procesem, který je společný všem, je metabolismus dusíku. Procesy specifickými pro genetické interakce jsou organizace organel a umlčování telomer. Pro regulaci transkripce jsou specifické buněčná odpověď na sloučeniny arsenu a filamentární růst.

Interpretace dat získaných analýzou promotoru *VPS34* je nejnáročnější částí celého procesu. Je nutné mít na paměti, že výstupem bioinformatických analýz je predikce, respektive

model, jak by se daný systém (v tomto případě TF či genové interakce) měl chovat na základě známých dat. Pro zvýšení pravděpodobnosti správného výsledku se obvykle využívá více metod (programů) a výsledkem analýzy je jejich konsensus. Jak je však patrné z Obr. 5.1, použité predikční databáze se významně rozcházejí nejen mezi sebou (10 společně predikovaných TF z celkových 70 predikovaných TF), ale také se seznamem známých TF regulujících transkripci *VPS34* (pouze 1, respektive 2 TF predikovány ve shodě se seznamem 23 experimentálně prokázaných TF).

Dalším kritériem zvyšujícím pravděpodobnost, že daný TF skutečně reguluje transkripci *VPS34*, je počet potenciálních vazebných míst v promotoru. Na druhou stranu, vysoký počet potenciálních vazebných míst ještě neznamená, že se na ně TF skutečně váže – mohou být nepřístupná kvůli nukleozomům (*Lu et al., 1994*), nebo může být pro vazbu daného TF vyžadována interakce s jiným proteinem či proteiny, jako je tomu v případě heterodimeru Pip2p-Oaf1p (*Rottensteiner et al., 1997*). Rovněž nemusí být známy všechny rozpoznávané vazebné motivy sledovaného TF, nebo mohou být stejné motivy rozeznávány více TF, a může tedy docházet ke kompetici o vazebné místo. Stejné motivy podle databáze YEASTRACT rozeznávají např. Fkh1p a Fkh2p, Rtg1p a Rtg3p, Yap1p a Yap3p, či Msn2p, Msn4p, Nrg1p a Rph1p (*Teixeira et al., 2014*).

Při interpretaci výsledků analýzy promotoru nebo genetických interakcí je rovněž nezbytné si uvědomit, že vstupní data z databází byla získána za konkrétních kultivačních podmínek a způsob regulace transkripce „našeho genu“ (pozitivní či negativní) nebo typ interakce mezi geny nemusí být obecně platný (totéž platí pro anotace jednotlivých genů/proteinů). Může se lišit právě v závislosti na způsobu kultivace (různé zdroje uhlíku či dusíku, submerzní kultivace či kultivace na pevném médiu), nebo stáří buněčné kultury. Velkou roli samozřejmě hraje použitý kmen *S. cerevisiae*. Odlišné experimentální podmínky různých autorů jsou důvodem, proč např. delece *MOT3* vede ke snížení či zvýšení filamentárního růstu a jeho zvýšená exprese k absenci či zvýšení invazivního růstu, přestože tyto fenotypy jsou zcela protichůdné (*Cherry et al., 2012*).

Problémem je také to, že většina dat byla získána nepřímou metodou, tedy například srovnáním exprese genů analýzou microarrayů mezi původním kmenem a kmenem se zvýšenou expresí zkoumaného TF. Je možné, že zvýšení transkripce sledovaného genu není způsobeno vazbou TF se zvýšenou expresí na jeho promotor, ale že tento zvýšeně exprimovaný TF reguluje expresi jiného (či více) TF, který následně nasedá na promotor sledovaného genu a reguluje jeho expresi. Ze všech experimentálně prokázaných TF regulujících expresi *VPS34* byla jejich vazba na promotor *VPS34* ověřena přímou metodou jen u Pip2p a Tos8p (pomocí ChIP-on-chip metody

– imunoprecipitací chromatinu spojenou s DNA microarrayi). V případě *VPS15* byl takto ověřen pouze Mot3p (Teixeira et al., 2014).

Problematický je i výstup z algoritmu The GO Term Finder. Přestože využívá jako zdrojových dat manuálně revidovaných databází, nemusí mít pro dané geny či proteiny kompletní informace. Příkladem je Sok2p – přestože je známo, že může působit jako TF, algoritmus The GO Term Finder jej nezařadil do skupiny proteinů regulujících transkripci RNA polymerázou II (neuvedeno). Neúplnost výsledků z tohoto algoritmu dobře ilustrují Tab 5.1-5.5.

Predikce regulace transkripce *VPS34* naznačila mnoho různých procesů, do kterých by mohl být Vps34p zapojen, je však třeba tato *in silico* získaná data ověřit experimentálně *in vivo*. Například přípravou kmene s odstraněným genem pro konkrétní TF a kmene s uměle zvýšenou expresí daného TF, u kterých by se sledovala exprese *VPS34* pomocí kvantitativní PCR ve srovnání s rodičovským kmenem. Rovněž by bylo možné ověřit vazbu konkrétního TF do promotoru *VPS34* náhradou (potenciálních) vazebných motivů v promotoru *VPS34* odlišnou sekvencí a sledováním exprese *VPS34* nebo pomocí metody ChIP-Seq (z angl. *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*). Nutností by bylo použití různých kultivačních podmínek, například kultivace v submerzní kultuře, kultivace na pevném médiu, využití různých zdrojů uhlíku či dusíku, přidání iontů kovů, nebo fungicidů do média, kultivace za různých teplot a pH média a podobně.

Účast Vps34p v neobvykle velkém počtu fyziologických procesů pravděpodobně vyplývá z jeho výjimečných interakčních schopností. Vps34p je PtdIns-3-kináza (Schu et al., 1993) a může tedy pomocí PtdIns3P ovlivnit buněčné procesy prostřednictvím interakce s proteiny s vazebnou doménou FYVE (Burd a Emr, 1998), PX (Yu a Lemmon, 2001), nebo dosud nepopsanou doménou jako např. u Atg18p (Strømhaug et al., 2004), viz Tab. 3.2. Kromě PI3K aktivity má Vps34p také proteinkinázovou aktivitu a může se autofosforylovat nebo jako serin/threonin proteinkináza fosforylovat ostatní buněčné proteiny (Stack a Emr, 1994, Bodenmiller et al., 2010), viz Tab. 3.1. Rovněž by mohl fungovat jako součást proteinového komplexu, kde by umožnil vazbu dalších proteinů, a usnadňoval tak interakci mezi proteiny – tak jako v případě PI3K komplexů I a II (Kihara et al., 2001).

V případě Vps15p jsou možnosti zapojení do buněčných procesů jen dvě – jako serin/threonin proteinkináza nebo jako interakční partner pro jiné proteiny (Stack et al., 1993; Kihara et al., 2001).

Protože všechny nalezené buněčné procesy jsou podporovány experimentálními daty, podrobněji uvádím jen několik vybraných – metabolismus dusíku, buněčný cyklus, buněčná odpověď na poškození DNA a filamentární růst.

Metabolismus dusíku je jediným buněčným procesem, který jsem našel u genetických interakcí s *VPS15* i *VPS34* a zároveň u TF regulujících transkripci *VPS15* i *VPS34*. V případě genetických interakcí to byl druhý nejčastěji zastoupený buněčný proces (prvním byla organizace organel) a u TF regulujících expresi *VPS15/VPS34* to byl nejčastěji zastoupený buněčný proces. Celkem 9 z 15 genů, jejichž současná delece s *VPS34* je synteticky letální, je zapojeno do metabolismu dusíku. To dokazuje významnost Vps15p a Vps34p pro metabolismus dusíku. Vysvětlením těchto výsledků je klíčová role, kterou hrají Vps15p a Vps34p při regulaci makroautofágie, Cvt dráhy (Kihara *et al.*, 2001), ER-fágie (van Zutphen *et al.*, 2014), nukleofágie (Krick *et al.*, 2008), pexofágie (Grunau *et al.*, 2011) a filamentárního růstu (Adhikari a Cullen, 2015), tedy procesech, které jsou aktivovány při hladovění na dusík.

Z analýzy genových interakcí s *VPS34* vyplývá, že 8 z 15 genů, jejichž současná delece s *VPS34* vede k syntetické letalitě, je spojeno s buněčným cyklem. Celkově je s buněčným cyklem spojeno 24 ze 39 genů interagujících s *VPS34*, v případě *VPS15* je to 15 z 21 genů. Na základě manuálního procházení anotací jednotlivých TF regulujících expresi *VPS34* (predikovaných i experimentálně ověřených) jsem zjistil, že 15 TF je spojeno s buněčným růstem. To vše nasvědčuje zapojení Vps15p a hlavně Vps34p do buněčného cyklu. Je známo, že PI3K Vps34p (a tedy i její regulátor Vps15p), respektive její produkt PtdIns3P, ovlivňují proteiny s vazebnou doménou pro PtdIns3P, z nichž některé hrají (případně mohou hrát) roli při replikaci DNA, rozchodu organel mezi mateřskou a dceřinou buňkou, tvorbě spor a regulaci meiózy (viz Tab. 3.2). Protein Vps34p je u *S. cerevisiae* nezbytný pro správnou segregaci vakuol mezi mateřskou a dceřinou buňkou (Herman a Emr, 1990). Rovněž je zapojen (spolu s Vps15p) do feromonové signální dráhy, kdy je jeho PI3K aktivita pozitivně regulována α podjednotkou trimerního G proteinu Gpa1p (Slessareva *et al.*, 2006). Při deleci *VPS34* nedochází k sekreci aktivního α -faktoru (Banuelos *et al.*, 2010). Proteiny kódované *VPS* geny (včetně *VPS15* a *VPS34*) také ovlivňují délku telomer. Přestože mechanismus není známý, hraje zde roli aktivita telomerázy a heterodimeru Ku (Rog *et al.*, 2005).

V savčích buňkách je protein Vps34 v průběhu mitózy (od profáze po anafázi) fosforylován cyklin-dependentními kinázami Cdk1 a Cdk5, což vede k inhibici jeho PI3K aktivity, a tím i autofágie. Autoři se domnívají, že se jedná o prevenci buňky před nechtěnou degradací Golgiho aparátu a endozomů během mitotického buněčného dělení (Furuya *et al.*, 2010). Homologem Cdk5 je u *S. cerevisiae* Pho85p, který je rovněž negativním regulátorem autofágie (Nishizawa *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001). Fosforylace Vps34p proteinem Pho85p však nebyla dosud publikována.

Výsledky analýzy genů interagujících s *VPS15* ukazují, že 12 z 21 genů je spojeno

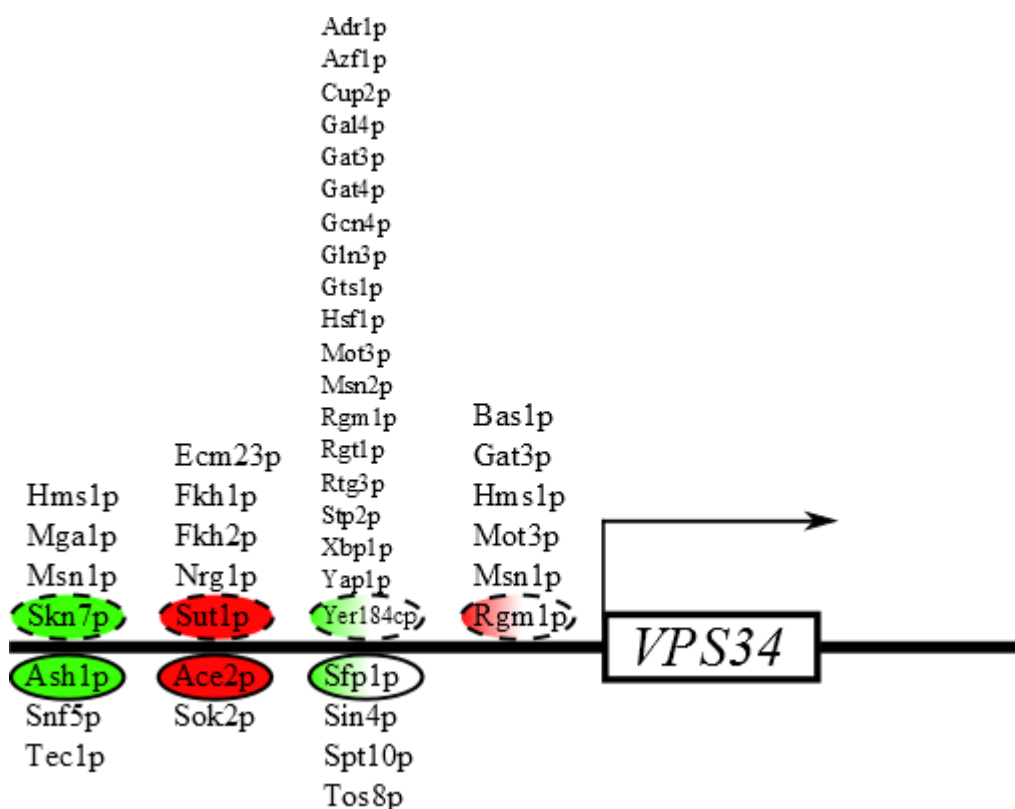
s buněčnou odpovědí na poškození DNA, v případě *VPS34* je to 23 ze 39 interagujících genů. Analýza promotoru *VPS34* ukázala, že 9 TF je spojeno s reparací DNA. Tyto výsledky potvrzují, že Vps15p a hlavně Vps34p jsou zapojeny do reparace DNA. Je známo, že u *S. cerevisiae* existuje spojení (pravděpodobně více než jedno) mezi metabolismem fosfatidylinositolu a replikací a reparací DNA, kdy narušení metabolismu fosfatidylinositolu vede k narušení integrity genomu (Zewail et al., 2003). Mániková a kolektiv zjistili, že buňky *S. cerevisiae* s odstraněným genem *VPS34* jsou vysoce citlivé na seleničitan sodný, který vyvolává poškození DNA produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS, z angl. *Reactive Oxygen Species*) (Mániková et al., 2012). Na druhou stranu nelze vyloučit, že v tomto případě není Vps34p zapojen do reparace DNA, ale do odstraňování ostatních makromolekul poškozených ROS pomocí pozitivní regulace autofágie.

Oproti tomu v lidských buňkách vede poškození DNA k fosforylaci Vps34p, ubiquitinylaci a jeho následné degradaci v proteazomu, což má za následek inhibici endocytózy povrchových receptorů a autofágie. Tato dráha je regulována proteinem p53 (Xiao et al., 2015).

Mechanismus, či spíše mechanismy, které jsou v pozadí spojení mezi Vps15p/Vps34p a reparací DNA, však nejsou známy. Vps15p a Vps34p zřejmě ovlivňují aktivitu heterodimeru Ku (Rog et al., 2005), a tak by se mohly podílet na rozpoznávání poškození DNA a na opravách DNA. Proteiny Yku70p a Yku80p, které tento heterodimer tvoří, totiž rozpoznávají dvouvláknové zlomy DNA a podílí se na opravách DNA pomocí homologní rekombinace a spojování nehomologních konců (Milne et al., 1996; Cervelli a Galli, 2000).

Na základě analýzy regulace exprese *VPS15* a *VPS34* je patrné, že Vps15p i Vps34p hrají také roli při filamentárním růstu a jsou během tohoto procesu regulovány již na transkripční úrovni (viz Obr. 5.2). Tomu odpovídají i experimentální data ukazující, že TF pozitivně ovlivňující filamentární růst (Ash1p, Snf5p a Tec1p) či negativně ovlivňující filamentární růst (Ace2p a Sok2p) skutečně pozitivně, respektive negativně ovlivňují expresi *VPS34* (viz Tab. 5.4). Stejně tak je tomu v případě TF, u kterých lze předpokládat pozitivní regulaci filamentárního růstu (Sfp1p, Sin4p a Spt10p). Transkripce *VPS15* je regulována negativně pomocí Ace2p a Sok2p (negativní regulátory filamentárního růstu) a pozitivně pomocí Ash1p, Rme1p, Ste12p a Tec1p (pozitivní regulátory filamentárního růstu), což by nasvědčovalo zapojení Vps15p do filamentárního růstu. Jeho transkripce je však negativně regulována pomocí Phd1p, který je pozitivním regulátorem filamentárního růstu (viz Tab. 5.5). Delece *VPS15* nevede ke ztrátě schopnosti invazivního růstu (Sarode et al., 2011), ale není známo, jak je tomu u pseudohyálního růstu. Mé experimentální výsledky však ukazují, že delece *VPS15* negativně ovlivňuje invazivní růst (viz kapitola 5.2.4).

Filamentární růst a tvorba biofilmu jsou nezbytným předpokladem pro virulenci a rezistenci k léčivům u některých mikrobiálních patogenů, např. kvasinek rodu *Candida* (Lo et al., 1997; Douglas, 2003). U *C. albicans* je Vps34p nezbytný pro filamentární růst na pevném médiu a pro regulaci hyfálního růstu v matrici (Bruckmann et al., 2000; Kitanovic et al., 2005). U *S. cerevisiae* buňky s delecí *VPS34* (ne však s delecí *VPS15*) nejsou schopny invazivního růstu a Vps15p i Vps34p jsou nezbytné pro tvorbu biofilmu (Sarode et al., 2011). Studie z letošního roku prokázala, že všechny fosfoinositidy, respektive s nimi spojené lipidkinázy a lipidfosfatázy, přímo ovlivňují filamentární růst a tvorbu biofilmu (Adhikari a Cullen, 2015). Vliv Vps15p na filamentární růst však zkoumán nebyl.



Obr. 5.2: Regulace transkripce *VPS34* při filamentárním růstu.

Model regulace transkripce *VPS34* sestavený na základě analýzy promotoru *VPS34*. Pokud je dostatek živin a buňky jsou mladé, exprese *VPS34* je reprimována TF, které jsou represory filamentárního růstu (Ace2p, Ecm23p atd.). V případě hladovění na dusík (diploidní buňky) nebo starších kolonií na bohatém médiu (haploidní buňky) je aktivována exprese *VPS34* TF, které jsou aktivátory pseudohyfálního, respektive invazivního růstu (Ash1p, Hms1p atd.). Uvedeny jsou pouze TF spojené s filamentárním (invazivním či pseudohyfálním) růstem. Plnou čarou jsou označeny TF, o nichž je známo, že regulují transkripci *VPS34*, přerušovanou čarou predikované TF. Zelená barva značí pozitivní, červená barva negativní regulaci filamentárního růstu. Políčko vybarvené jen z poloviny znamená možné zapojení do regulace filamentárního růstu (podle barvy pozitivní či negativní). K danému typu regulace patří i TF uvedené pod, respektive pod, barevnými políčky. Pozice TF nemusí odpovídat skutečné pozici vazebného místa. Vyšší počet potenciálních vazebných míst některých TF není vyznačen. Vytvořeno podle Tab. 5.3 a 5.4.

5.2 Analýzy kmenů s delecí genů zapojených do PI3K signální dráhy

Cílem této části diplomové práce bylo určit, jaký vliv má narušení PI3K signální dráhy u přírodních i laboratorních kmenů *S. cerevisiae* s nezávislým genetickým pozadím na vývoj a morfologii kolonií a buněk.

5.2.1 Příprava delečních kmenů odvozených od přírodních kmenů

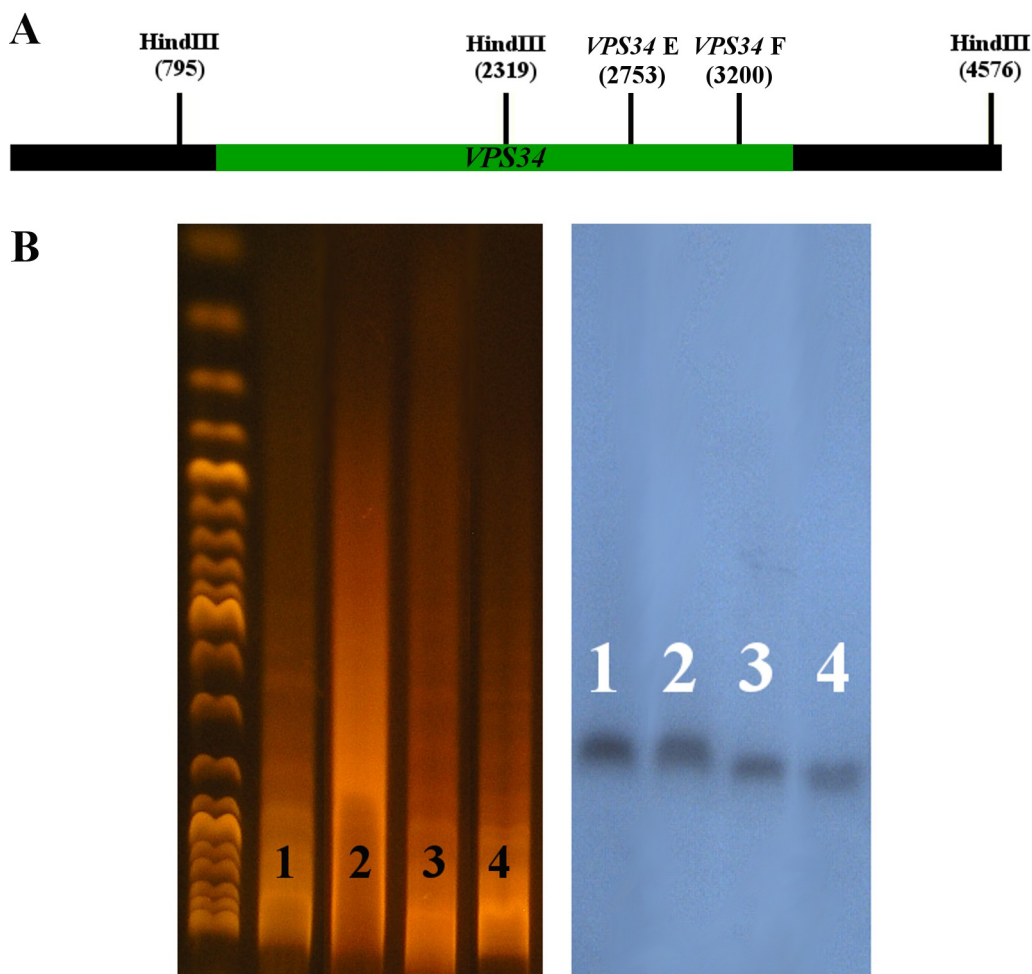
Cíl: Připravit kmeny *vps34Δ* odvozené od rodičovských kmenů BR-F, BR-F Flo11p-GFP a PORT.

Kmeny s delecí genu *VPS34* jsem připravoval od přírodních diploidních kmenů *S. cerevisiae* – BR-F, BR-F Flo11p-GFP a PORT. Po první transformaci deleční kazetou s genem *kanMX* jsem monodeleční buňky selektoval na glycerolovém médiu (GM) s geneticinem (G418). U pozitivních klonů jsem pomocí PCR ověřil vložení deleční kazety a přítomnost další alely *VPS34*.

Pro odstranění druhé alely jsem použil deleční kazetu s genem *nat1*. Pozitivní klony jsem selektoval na GM s nurseotricinem (Nat) a poté ověřoval rezistenci ke geneticinu. Pomocí PCR jsem ověřil vložení obou delečních kazet – úspěšnost správného vložení obou delečních kazet byla u testovaných klonů ~5 % (testoval jsem kolonie narostlé na GM+G418 i GM+Nat, 68 klonů od kmene PORT a 54 klonů od kmene BR-F Flo11p-GFP). Všechny získané klony odvozené od přírodních diploidních kmenů však stále nesou další alelu/alely *VPS34*, což jsem ověřil pomocí PCR a sekvenací PCR produktu vnitřního úseku *VPS34* (primery *VPS34 E* a *VPS34 F*, viz Obr. 5.3). Tyto připravené kmeny s genotypem *vps34/vps34/VPS34* mají stejnou morfologii kolonií jako rodičovské kmeny.

Rozhodl jsem se proto pomocí restriční analýzy a následného Southern blotu s hybridizací určit, zda je sekvence *VPS34* u kmenů s genotypem *vps34/vps34/VPS34* odvozených od kmenů PORT a BR-F unikátní (Obr. 5.3). Sekvence *VPS34* je u rodičovských i připravených kmenů unikátní – nevyskytuje se v genomu ve více kopiích lišících se svojí délkou. Je však rozdíl ve velikosti alel *VPS34* mezi kmeny odvozenými od BR-F a mezi kmeny odvozenými od kmene PORT. Protože sekvenace vnitřního úseku kódující sekvenace *VPS34* (primery *VPS34 E* a *VPS34 F*) prokázala, že sekvence odpovídá referenční sekvenci *VPS34* v SGD a použití různých kombinací ověřovacích primerů při PCR neukázalo rozdíly ve velikosti produktů mezi kmeny BR-F a PORT lze předpokládat, že rozdílná velikost fragmenů *VPS34* při Southern blotu je způsobena rozdílnými sekvencemi v oblasti 3' za kódující sekvencí *VPS34*.

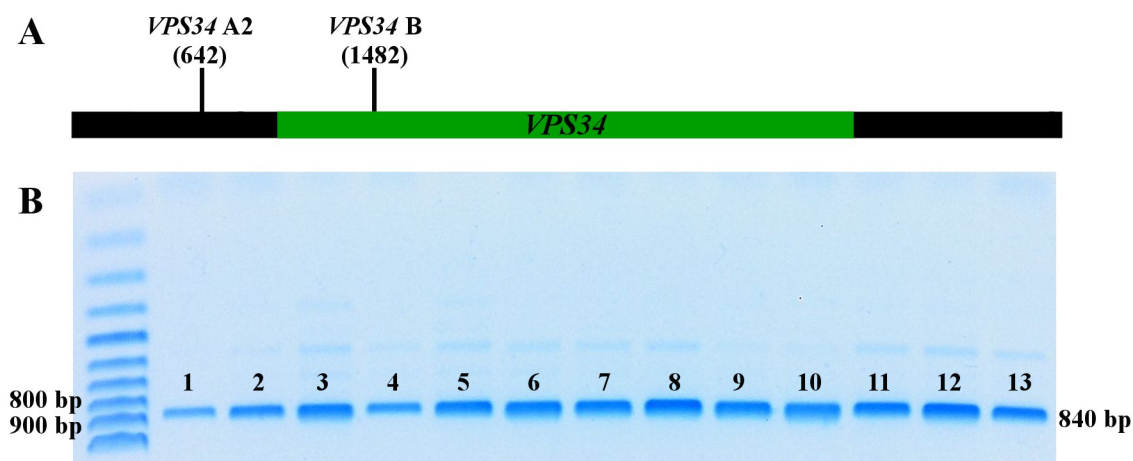
Abych připravil kmeny s úplnou delecí *VPS34*, pokusil jsem se o odstranění třetí alely. U kmenů odvozených od rodičovských kmenů BR-F, BR-F Flo11p-GFP a PORT s genotypem *vps34/vps34/VPS34* jsem pomocí Cre-Lox systému odstranil vložené deleční kazety s geny pro rezistence. Purifikované kmeny jsem znovu transformoval deleční kazetou s *kanMX* a pozitivní klony selektoval na GM+G418. Získal jsem po jednom klonu od kmenů BR-F a PORT. Ověření pomocí PCR však prokázalo, že oba získané klony nesou další alelu *VPS34* a mají tedy genotyp *vps34/vps34/vps34/VPS34* (Obr. 5.4).



Obr. 5.3: Southern analýza kmenů BR-F *vps34/vps34/VPS34*, PORT *vps34/vps34/VPS34* a rodičovských kmenů. A – schématické znázornění restrikčních míst Hind III a nasedání primerů *VPS34* E a *VPS34* F v sekvenci *VPS34* (+/- 1kbp). Kódující sekvence je vyznačena zeleně. B – Genomovou DNA z kmenů BR-F (1), BR-F *vps34/vps34/VPS34* (2), PORT (3) a PORT *vps34/vps34/VPS34* (4) jsem štěpil enzymem Hind III a fragmenty *VPS34* jsem detekoval radioaktivně značenou sondou komplementární k oblasti vymezené primery *VPS34* E a *VPS34* F. Očekávaná velikost fragmentu je 2257 bp. Velikost fragmentů 1 a 2 je ~2250 bp, velikost fragmentů 3 a 4 je ~2300 bp.

Přítomnost další alely po odstranění 2 nebo 3 alel byla výsledkem všech nezávisle provedených transformací diploidních přírodních kmenů se selekcí na GM s antibiotikem. Při

studiu literatury o Vps34p jsem našel informace, že delece *VPS34* vede k tzv. petit fenotypu, neboli k absenci respiračního růstu (Yoshida a Anraku, 2000). Provedl jsem tedy novou transformaci, při které jsem monodeleční kmeny připravené na GM transformoval deleční kazetou s *nat1* (připravenou s použitím vnitřních delečních primerů *VPS34* FD2 a *VPS34* RD2). Pozitivní klony jsem selektoval na glukózovém médiu (YD) s Nat. Nežískal jsem však žádný klon, který by měl správně vložené obě deleční kazety.

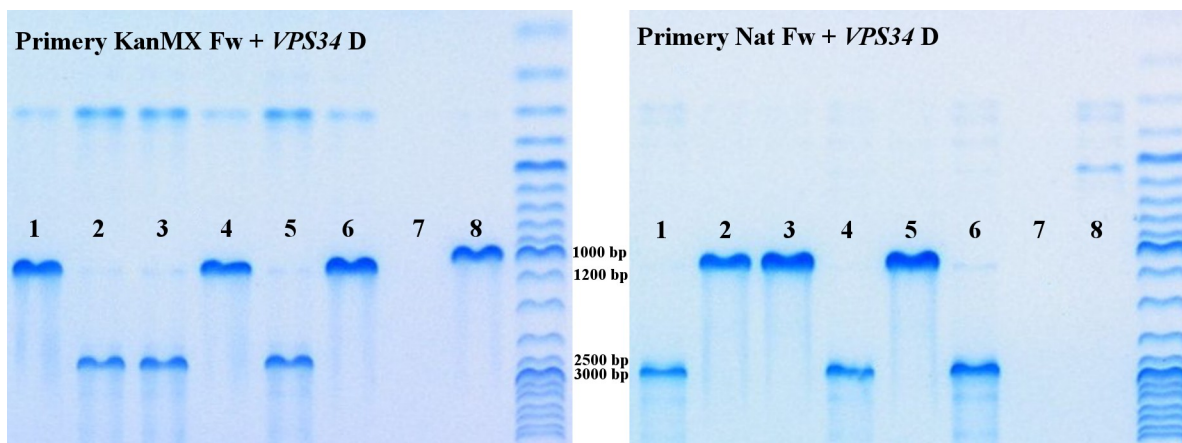


Obr. 5.4: Ověření přítomnosti alely *VPS34* u připravených kmenů s delecí *VPS34*

A – schématické znázornění nasedání primerů *VPS34* A2 a *VPS34* B v sekvenci *VPS34* (+/- 1kbp). Kódující sekvence je vyznačena zeleně. B – přítomnost alely *VPS34* u připravených kmenů ve srovnání s rodičovskými kmeny jsem ověřoval pomocí PCR s primery *VPS34* A2 a *VPS34* B. 1 – BR-F, 2-5 BR-F *vps34/vps34/VPS34*, 6-9 – PORT *vps34/vps34/VPS34*, 10-12 – PORT *vps34/vps34/vps34/VPS34* a 13 - PORT *vps34/VPS34*. Velikost PCR produktu odpovídá očekávané velikosti (840 bp). Fotografie gelu je barevně invertována.

Připravil jsem proto znovu monodeleční kmeny od kmenů BR-F, BR-F Flo11p-GFP a PORT (deleční kazeta s *kanMX*, selekce na YD+G418), které jsem poté transformoval druhou deleční kazetou s *nat1* (s vnitřními delečními primery) a selekcí na YD+G418+Nat. Úspěšnost vložení obou delečních kazet byla u testovaných klonů mezi 15 a 30 %. Získané kmeny jsem ověřil pomocí PCR a zjistil, že mají vloženy obě deleční kazety, ale zřejmě obě v jednom lokusu (Obr. 5.5). Rovněž je přítomna další alela *VPS34*, a tak i tyto kmeny mají genotyp *vps34/vps34/VPS34*. Morfologie kolonií při kultivaci na YD je oproti rodiči nezměněna.

Nepodařilo se mi připravit žádný kmen s úplnou delecí *VPS34* odvozený od diploidních přírodních kmenů.



Obr. 5.5: PCR ověření připravených delečních kmenů odvozených od rodičovského kmene PORT

1-6 – kmeny odvozené od kmene PORT po druhé transformaci deleční kazetou. 7 – prázdná reakce, 8 – BY4742 *vps34Δ* EUROSCARF. Očekávaná velikost PCR produktu *KanMX Fw + VPS34 D* je 1054 bp a produktu *Nat Fw + VPS34 D* 1013 bp. U kmenů 1-6 zřejmě došlo k integraci jedné kazety do druhé, čemuž nasvědčuje přítomnost další alely *VPS34* u těchto kmenů (nevyobrazeno). Velikost PCR produktu u BY4742 *vps34Δ* EUROSCARF je ve srovnání s připravenými kmeny 1-6 o ~100 bp kratší. Fotografie gelu je barevně invertována.

5.2.2 Příprava delečních kmenů odvozených od laboratorních kmenů

Cíl: Připravit kmeny *vps34Δ* a *vps15Δ* odvozené od rodičovských kmenů BY4742 a Σ^h .

Kmeny s delecí *VPS34* jsem připravoval také od haploidních laboratorních kmenů BY4742 a Σ^h . Transformoval jsem tyto kmeny deleční kazetou s *kanMX* a selektoval pozitivní klony na GM+G418. Takto jsem získal od každého rodičovského kmene jeden kmen s vloženou deleční kazetou. Přestože se jedná o haploidní kmeny s jednou kopií *VPS34*, pomocí PCR jsem ověřil, že všechny mají genotyp *vps34/VPS34*. Morfologie kmene BY4742 *vps34/VPS34* je ve srovnání s rodičovským kmenem nezměněna, kmen odvozený od Σ^h vytváří při růstu na GM zpočátku hladké kolonie a tvorba strukturovaných kolonií je opožděna (nevyobrazeno). Laboratorní kmeny se tedy při transformaci a následné selekci na GM chovaly podobně jako přírodní kmeny.

Po zjištění, že delece *VPS34* vede k absenci respiračního růstu (Yoshida a Anraku, 2000), jsem transformoval buňky deleční kazetou s *nat1* a provedl selekci na YD+Nat. Od kmene BY4742 jsem získal několik klonů se správně vloženou deleční kazetou, všechny však nesou další alelu *VPS34*. Od kmene Σ^h jsem nezískal žádný pozitivní klon. Stejných výsledků jsem dosáhl při transformaci deleční kazetou s *kanMX* a selekcí na YD+G418. Nepomohla ani optimalizace transformačního postupu – různá množství transformační DNA, zkrácení délky tepelného šoku nebo prodloužení kultivace v YD před výsevem na selektivní plotny.

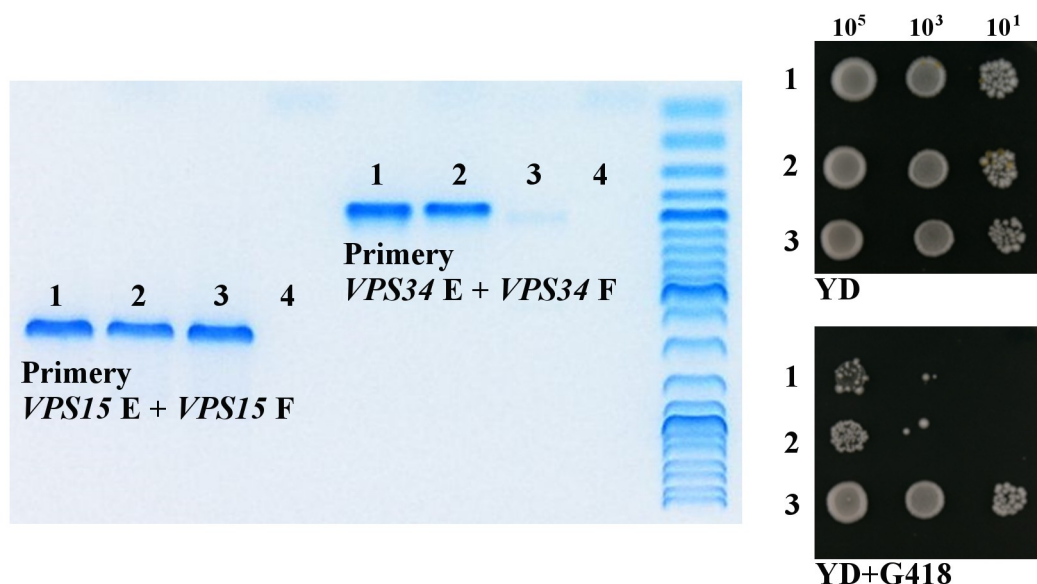
Kmeny s delecí *VPS15* nejsou schopné respiračního růstu (Merz a Westermann, 2009). Buňky jsem tedy transformoval deleční kazetou s *nat1* a provedl selekci na YD+Nat. Od kmene BY4742 i od kmene ΣS^h jsem získal více klonů, které měly správně vloženou deleční kazetu a nenesly žádnou další alelu *VPS15*. U těchto kmenů jsem sledoval morfologii kolonií a buněk, růstovou rychlost a citlivost k inhibitorům, viz dále.

5.2.3 Ověření delečních kmenů BY4742 *vps15Δ* a BY4742 *vps34Δ* ze sbírky EUROSCARF

Cíl: Ověřit, zda deleční kmeny BY4742 *vps15Δ* a BY4742 *vps34Δ* ze sbírky EUROSCARF mají odstraněné geny *VPS15*, respektive *VPS34*.

Protože jsem nebyl schopen připravit kmen BY4742 *vps34Δ*, použil jsem kmen BY4742 *vps34Δ* ze sbírky European Saccharomyces Cerevisiae Archive for Functional Analysis (EUROSCARF). Ověření pomocí PCR prokázalo, že kmen BY4742 *vps34Δ* má správně vloženou deleční kazetu s *kanMX*. Podle PCR ověření však nese intaktní alelu *VPS34*, přestože výsledný produkt PCR reakce s primery *VPS34* E a *VPS34* F je velmi slabý (Obr. 5.6). Kapkovým testem jsem prokázal, že BY4742 *vps34Δ* je schopný růstu na GM. Po přečištění kmene BY4742 *vps34Δ* výsevem na YD s následným přerazítkováním na GM a kontrolou klonů nerostoucích na GM pomocí PCR jsem získal čistý kmen BY4742 *vps34Δ*.

V případě kmene BY4742 *vps15Δ* ze sbírky EUROSCARF ověření pomocí PCR prokázalo, že tento kmen nemá integrovanou deleční kazetu a stále nese intaktní alelu *VPS15* (Obr. 5.6). Podobně jako nepřečištěný BY4742 *vps34Δ* je i tento kmen schopný růstu na GM, neroste však na YD+G418. Kmen BY4742 *vps15Δ* ze sbírky EUROSCARF tedy nelze použít pro další analýzy, protože nemá odstraněný gen *VPS15* ani nese deleční kazetu s *kanMX*.



Obr. 5.6: Ověřování kmenů BY4742 *vps15Δ* a BY4742 *vps34Δ* z EUROSCARF

Ověření přítomnosti alely *VPS15* a *VPS34* pomocí PCR: 1 – BY4742, 2 – BY4742 *vps15Δ*, 3 – BY4742 *vps34Δ* a 4 – reakce bez templátové DNA. Očekávaná velikost produktů *VPS15* E + *VPS15* F (1296 bp), *VPS34* E + *VPS34* F (447 bp) odpovídá produktům. Fotografie gelu je barevně invertována. Vpravo je vyobrazena růstová schopnost uvedených kmenů na YD a YD+G418. Přibližný počet buněk v jedné kapce (5 μ l) je uveden nad prvním snímkem.

5.2.4 Morfologická analýza kolonií připravených delečních kmenů

Cíl: Porovnat morfologii a vývoj kolonií připravených delečních kmenů *S. cerevisiae* odvozených od laboratorních kmenů BY4742 a Σ S^h. Srovnat růstovou rychlost připravených kmenů v porovnání s rodičovskými kmeny.

Delece *VPS15* i *VPS34* mají u kmene BY4742 významný negativní vliv na vývoj kolonií, zvláště v rané fázi vývoje (nejvýrazněji do 3. dne), viz Obr. 5.7. Rodičovský kmen kultivovaný na YD má nepravidelné okraje kolonie a zvýšený střed kolonie. Kmeny BY4742 *vps15Δ* a BY4742 *vps34Δ* mají okraje kolonií pravidelné a hladké. Morfologie buněk je u delečních kmenů ve srovnání s rodičovským kmenem nezměněna. Rodičovský kmen BY4742 ani od něj odvozené deleční kmeny nejsou schopné invazivního růstu a nevytvářejí tedy modré stopy (nevyobrazeno).

U kmene Σ S^h má delece *VPS15* podobný negativní vliv na vývoj kolonií jako u BY4742, viz Obr. 5.8. Rodičovský kmen Σ S^h má při kultivaci na YD mírně strukturované okraje a zvýšený střed kolonií. Kolonie Σ S^h *vps15Δ* mají pravidelné okraje, mírně zvýšený střed kolonie a v pozdější fázi vývoje (10. den) mají na povrchu papily. Invazivní růst je u Σ S^h *vps15Δ*

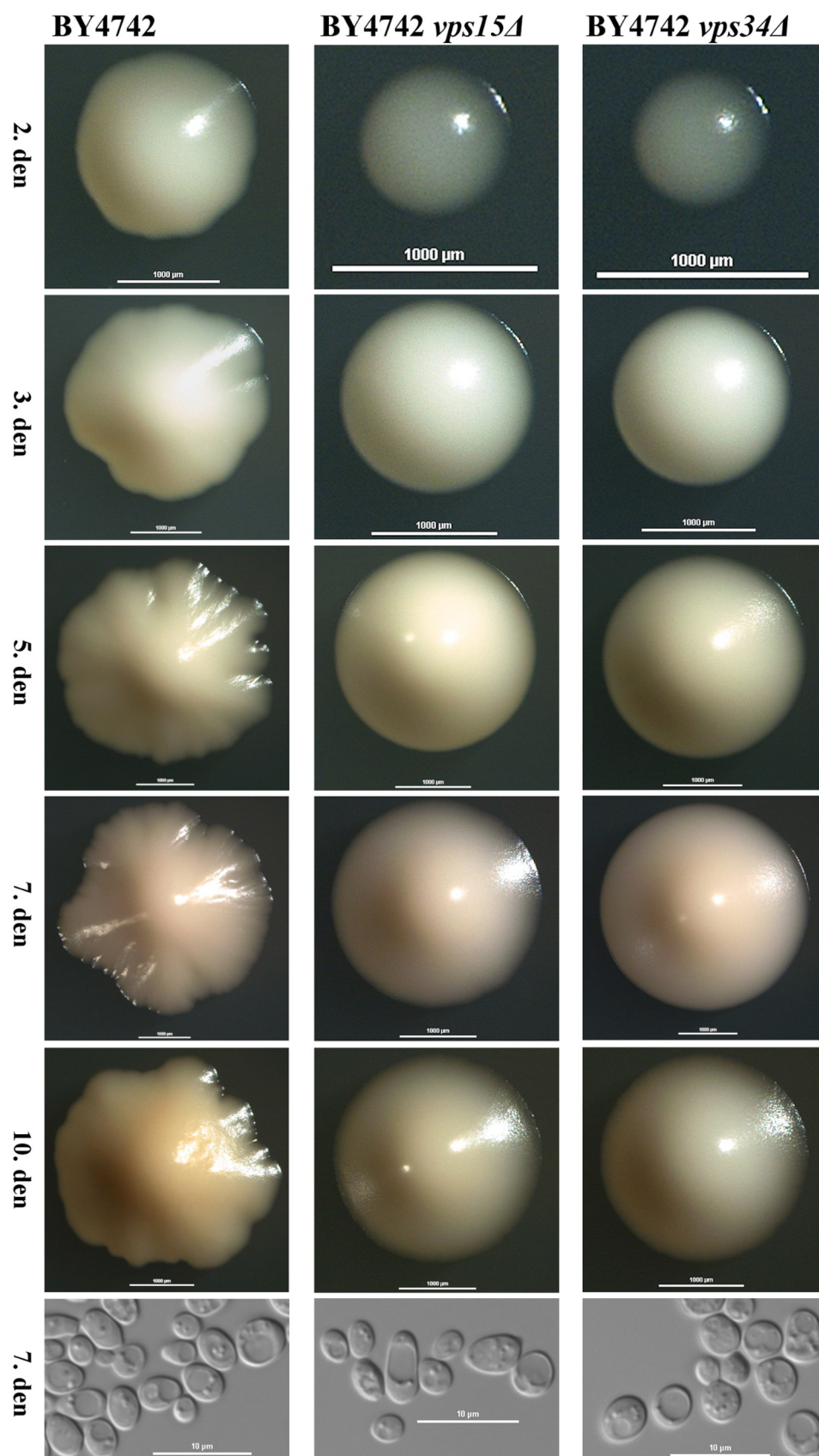
významně inhibován – 5. den je invazivní růst minimální a 10. den kultivace je stále méně výrazný než u rodičovského kmene 5. den kultivace. Buňky rodičovského kmene i kmene ΣS^h *vps15Δ* jsou často plné váčků. Avšak zatímco u rodičovského kmene jsou tyto buňky obvykle kulaté, u ΣS^h *vps15Δ* jsou spíše protáhlé.

Pátý den růstu na YD jsem pomocí programu Colony Counter zjišťoval průměrnou plochu monoklonií. Jak je patrné z Tab. 5.7, mezi delečními kmeny a rodičovskými kmeny je signifikantní rozdíl, který je viditelný již z fotografií dokumentujících morfologie kolonií jednotlivých kmenů (Obr. 5.7 a 5.8). Plocha kolonií kmene BY4742 *vps15Δ* je oproti rodičovskému kmeni menší přibližně o 40%. U kmene BY4742 *vps34Δ* je tento rozdíl podobný, přibližně 35 %. Kmen ΣS^h i kmen ΣS^h *vps15Δ* tvoří kolonie s větší plochou než kmen BY4742. Průměrná plocha kolonie kmene ΣS^h *vps15Δ* je přibližně o 35 % menší než u kmene rodičovského. Delece *VPS15* i *VPS34* mají podobný vliv na plochu kolonií u obou testovaných laboratorních kmenů.

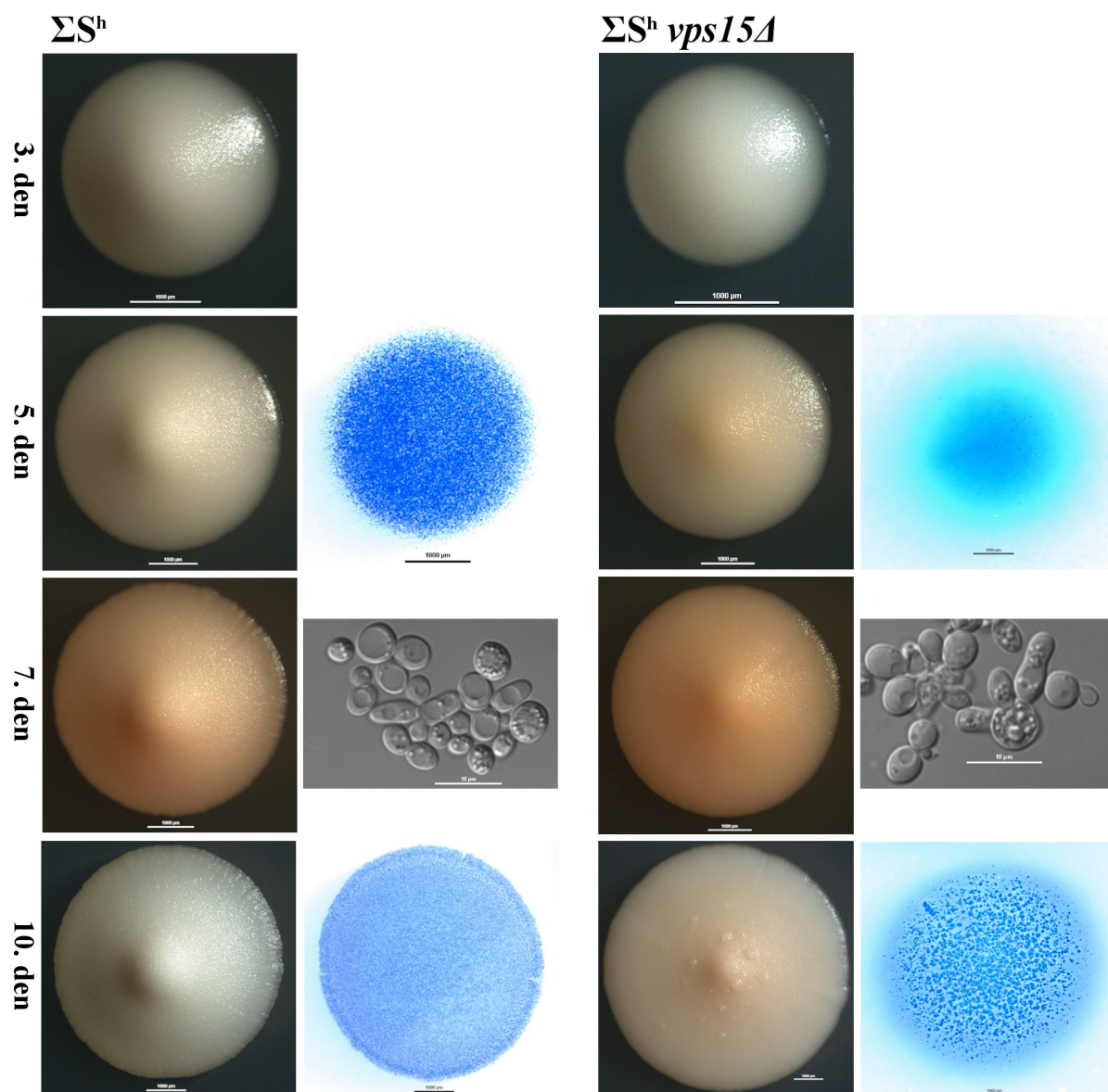
Tab. 5.7: Průměrná plocha pětidenních kolonií delečních kmenů odvozených od laboratorních kmenů rostoucích na YD

Kmen	Celkový počet kolonií	Průměrný počet kolonií na misce	Průměrná plocha kolonie (mm ²)	Směrodatná odchylka (mm ²)
BY4742	682	97	7,1	1,3
BY4742 <i>vps15Δ</i>	863	123	4,2***	0,3
BY4742 <i>vps34Δ</i>	667	95	4,7**	0,7
ΣS^h	976	98	11,9	1,1
ΣS^h <i>vps15Δ</i>	693	87	8,0***	0,5

Hladiny statistické významnosti: <0,05 = *, <0,01 = **, <0,001 = *** určené pomocí t-testu. Pro výpočet průměrné plochy kolonie jsem použil nejméně 7 misek od každého kmene.



Obr. 5.7: Morfologická analýza kmenů BY4742 *vps15Δ* a BY4742 *vps34Δ* v porovnání s rodičovským kmenem Morfologii kolonií jsem sledoval při kultivaci na YD 2., 3., 5., 7. a 10. den (měřítko 1 mm). Buňky pocházejí ze sedmidenních kolonií kultivovaných na YD (měřítko 10 μm).



Obr. 5.8: Morfologická analýza kmene ΣS^h *vps15Δ* v porovnání s rodičovským kmenem

Morfologii kolonií jsem sledoval při kultivaci na YD 3., 5., 7. a 10. den (měřítko 1 mm). Buňky pocházejí ze sedmidenních kolonií kultivovaných na YD (měřítko 10 μ m). Modré stopy kolonií ukazují schopnost invazivního růstu daného kmene (5. a 10. den, měřítko 1 mm).

5.2.5 Citlivost delečních kmenů k inhibitorům

Cíl: Sledovat vliv delece genů PI3K signální dráhy na fitness kolonie v přítomnosti inhibitoru.

Vliv inhibitorů na růst buněk jsem určoval pomocí kapkových testů, kdy jsem sledoval, jaké množství buněk je schopné růstu. Inhibitory jsem vybíral na základě jejich ověřeného používání v naší laboratoři a podle informací o jejich vlivu na Vps15p a Vps34p podle SGD (*Cherry et al., 2012*). Buněčnou suspenzi jsem ředil desítkovou řadou (viz Obr. 5.9 a 5.10) a růst kolonií jsem pozoroval 3., 5. a 7. den. Nezaznamenal jsem však významné rozdíly mezi jednotlivými dny kultivace. Uvedené snímky pocházejí ze 7. dne kultivace.

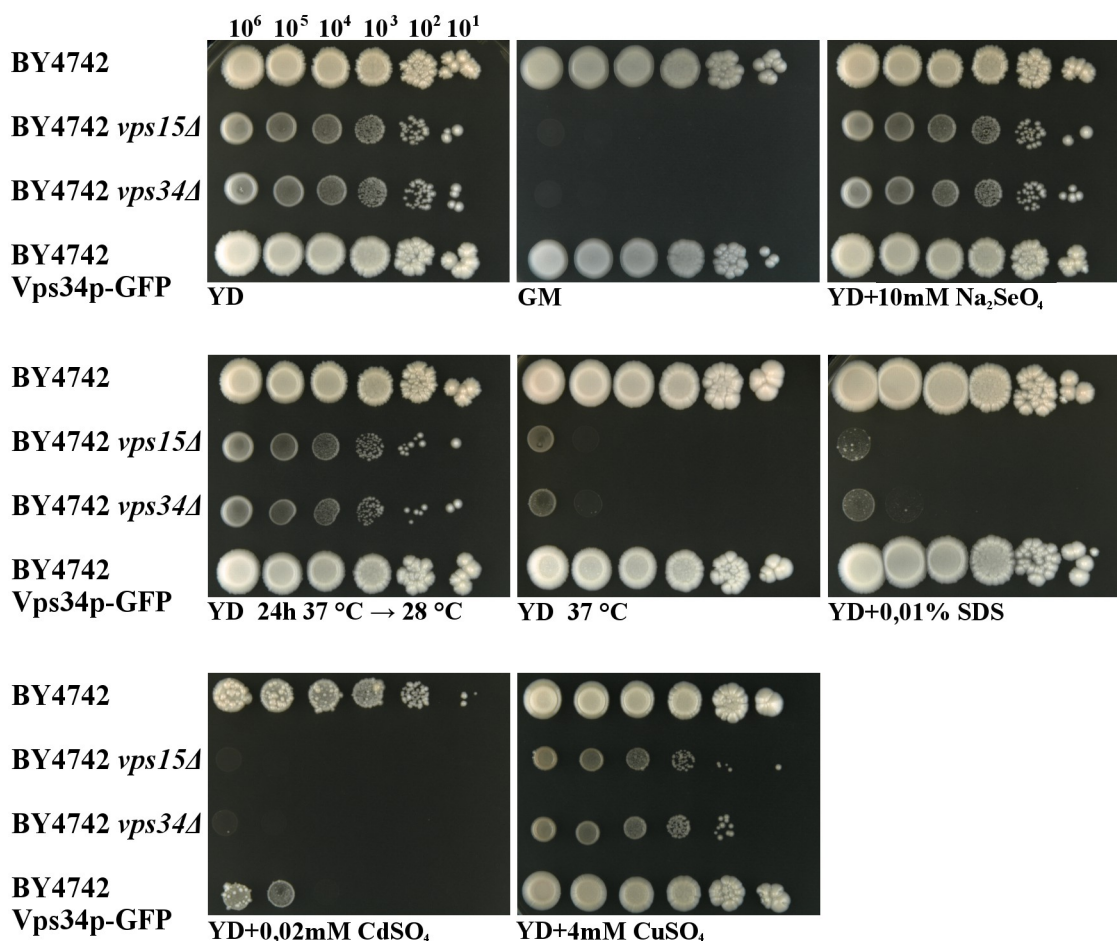
Vedle kmenů s delecí *VPS15*, nebo *VPS34* jsem rovněž testoval kmeny, které mají Vps34p značený na C-konci pomocí GFP. Protože testované laboratorní kmeny jsou haploidní, GFP značení by mohlo ovlivňovat PI3K aktivitu Vps34p, což by se projevilo při inhibitorových testech změnou schopnosti růstu v porovnání s rodičovským kmenem.

Kapkové testy kmenů odvozených od rodičovského kmene BY4742 potvrdily, že kmeny BY4742 *vps15Δ* a BY4742 *vps34Δ* mají ve srovnání s rodičovským kmenem nižší růstovou rychlost a nejsou schopné růstu na GM a jsou výrazně inhibované při kultivaci při 37 °C (Obr. 5.9). Oproti tomu kmen BY4742 Vps34p-GFP se při těchto podmínkách chová podobně jako rodičovský kmen. Přítomnost 10mM Na₂SeO₄ v médiu, nebo kultivace 24 hodin při 37 °C s následnou kultivací při 28 °C neměla na testované kmeny vliv (v porovnání s kontrolou na YD). Kmeny BY4742 *vps15Δ* a BY4742 *vps34Δ* jsou téměř neschopné růstu na YD+0,01% SDS a zcela neschopné růstu na YD+0,02mM CdSO₄. Rovněž mají inhibovaný růst při kultivaci na YD+4mM CuSO₄ a podle zabarvení kolonií akumulují více CuSO₄ než rodičovský kmen. Kmen BY4742 Vps34p-GFP roste na YD+0,01% SDS a YD+4mM CuSO₄ podobně jako rodičovský kmen. Při kultivaci na YD+0,02mM CdSO₄ je kmen BY4742 Vps34p-GFP přibližně 10⁴× citlivější než rodičovský kmen.

Kmen ΣS^h *vps15Δ* není schopný růstu při 37 °C, avšak na GM je jeho růstová schopnost snížena ve srovnání s rodičem 10⁴× (Obr. 5.10). Jeho růstová rychlost na YD je ve srovnání s rodičovským kmenem snížena a makrokolonie jsou hladké, případně mají papily. Přítomnost 10mM Na₂SeO₄ v médiu nemá vliv na jeho schopnost růstu, neindukuje však vrásčitost okrajů makrokolonií jako u rodičovského kmene. Rovněž má zpomalený růst při kultivaci na YD+4mM CuSO₄ a výrazně sníženou schopnost růstu při kultivaci 24 hodin při 37 °C s následnou kultivací

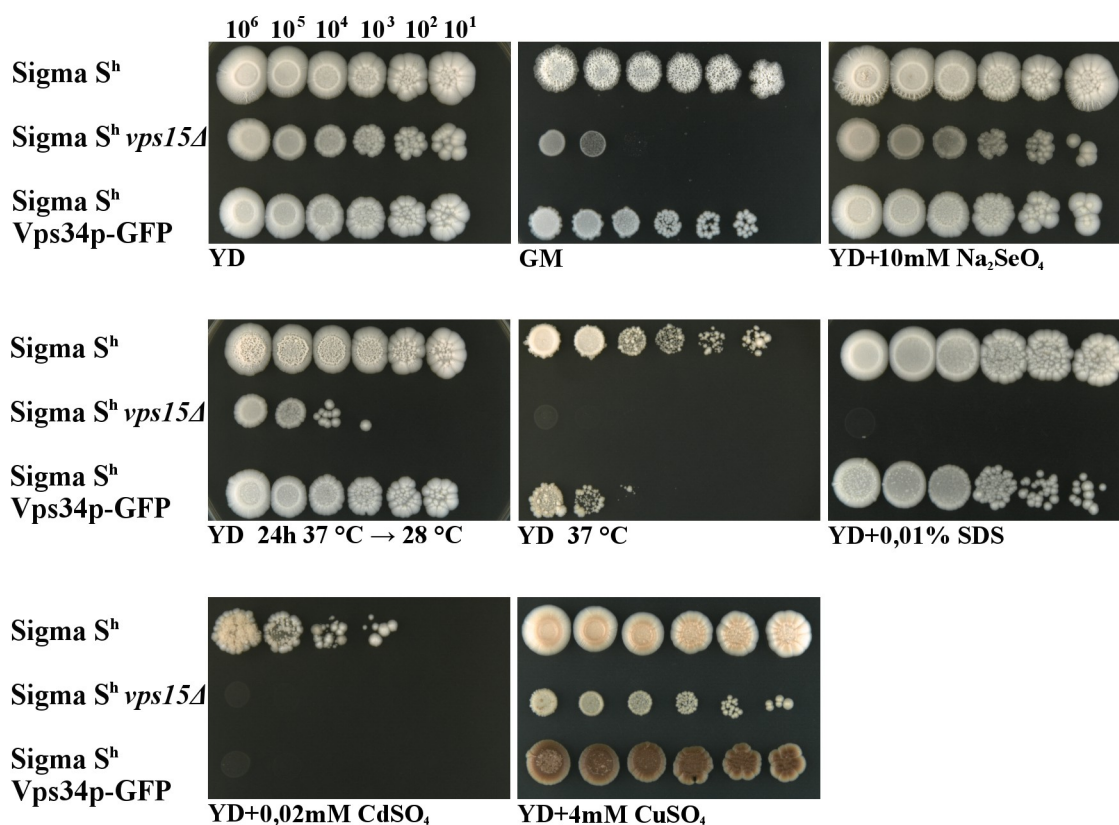
při 28 °C. Kmen Σ^h *vps15Δ* je také zcela neschopný růstu na YD+0,01% SDS a YD+0,02mM CdSO_4 .

Kmen Σ^h Vps34p-GFP se při inhibitorových testech liší od rodičovského kmene i od kmene Σ^h *vps15Δ*. Přestože jeho schopnost růstu na YD, GM, YD+10mM Na_2SeO_4 , YD+0,01% SDS, YD+4mM CuSO_4 , a při kultivaci 24 hodin při 37 °C s následnou kultivací při 28 °C je srovnatelná s rodičovským kmenem, jeho morfologie je odlišná. Rodičovský kmen vytváří na YD, GM a YD+10mM Na_2SeO_4 více či méně vrásčité makrokolonie. Kmen Σ^h Vps34p-GFP však vytváří makrokolonie spíše nestrukturované s četnými papilami. Podobně jako kmen Σ^h *vps15Δ* je i kmen Σ^h Vps34p-GFP neschopný růstu na YD+0,02mM CdSO_4 . Schopnost růstu kmene Σ^h Vps34p-GFP je rovněž inhibována při 37 °C a podle zabarvení kolonií akumuluje více CuSO_4 než rodičovský kmen.



Obr. 5.9: Kapkové testy kmenů odvozených od rodičovského kmene BY4742

Nakapával jsem suspenze buněk ředěné desítkovou řadou – přibližný počet buněk v jedné kapce (5 μl) je uveden nad prvním snímkem. Pokud není uvedeno jinak, kultivační teplota byla 28 °C. Označení 24h 37 °C → 28 °C znamená kultivaci 24 hodin při 37 °C, poté při 28 °C.



Obr. 5.10: Kapkové testy kmenů odvozených od rodičovského kmene ΣS^h

Nakapával jsem suspenze buněk ředěné desítkovou řadou – přibližný počet buněk v jedné kapce (5 μ l) je uveden nad prvním snímkem. Pokud není uvedeno jinak, kultivační teplota byla 28 °C. Označení 24h 37 °C \rightarrow 28 °C znamená kultivaci 24 hodin při 37 °C, poté při 28 °C.

Z Obr. 5.9 a 5.10 je patrné, že kmeny odvozené BY4742 nebo ΣS^h , které mají Vps34p značený na C-konci pomocí GFP se při permissivních podmínkách chovají podobně jako rodičovský kmen. Při selektivních podmínkách (v přítomnosti některých inhibitorů nebo při zvýšené kultivační teplotě) je však jejich schopnost růstu často významně snížena. Je tedy zřejmé, že C-koncové značení Vps34p pomocí GFP narušuje funkci Vps34p.

Rozdíly v citlivost k inhibitorům jsou rovněž mezi použitými laboratorními kmeny. Kmen ΣS^h je výrazně citlivější ke zvýšené teplotě kultivace (37 °C) a k 0,02mM CdSO₄ než kmen BY4742.

5.2.6 Citlivost buněk *S. cerevisiae* k inhibitoru KU-55933

Cíl: Stanovit citlivost přírodních a laboratorních kmenů *S. cerevisiae* k inhibitoru KU-55933.

Inhibitor KU-55933 je selektivním inhibitorem PI3K třídy III a autofágie u savců. Při použití 2 μ M KU-55933 je inhibována autofágie a při koncentraci 10 μ M je téměř zcela inhibována PI3K aktivita Vps34 (Farkas et al., 2011). Protože se mi nepodařilo připravit kmeny s delecí *VPS34* odvozené od přírodních kmenů BR-F a PORT, testoval jsem citlivost rodičovských kmenů BY4742, Σ S^h, BR-F a PORT k tomuto inhibitoru s cílem ověřit esencialitu *VPS34* u přírodních kmenů. Pro kontrolu, že případný vliv KU-55933 není způsoben narušením jiných buněčných procesů, jsem použil kmen BY4742 *vps34 Δ* .

Pomocí kapkového testu jsem sledoval růstovou schopnost buněk na:

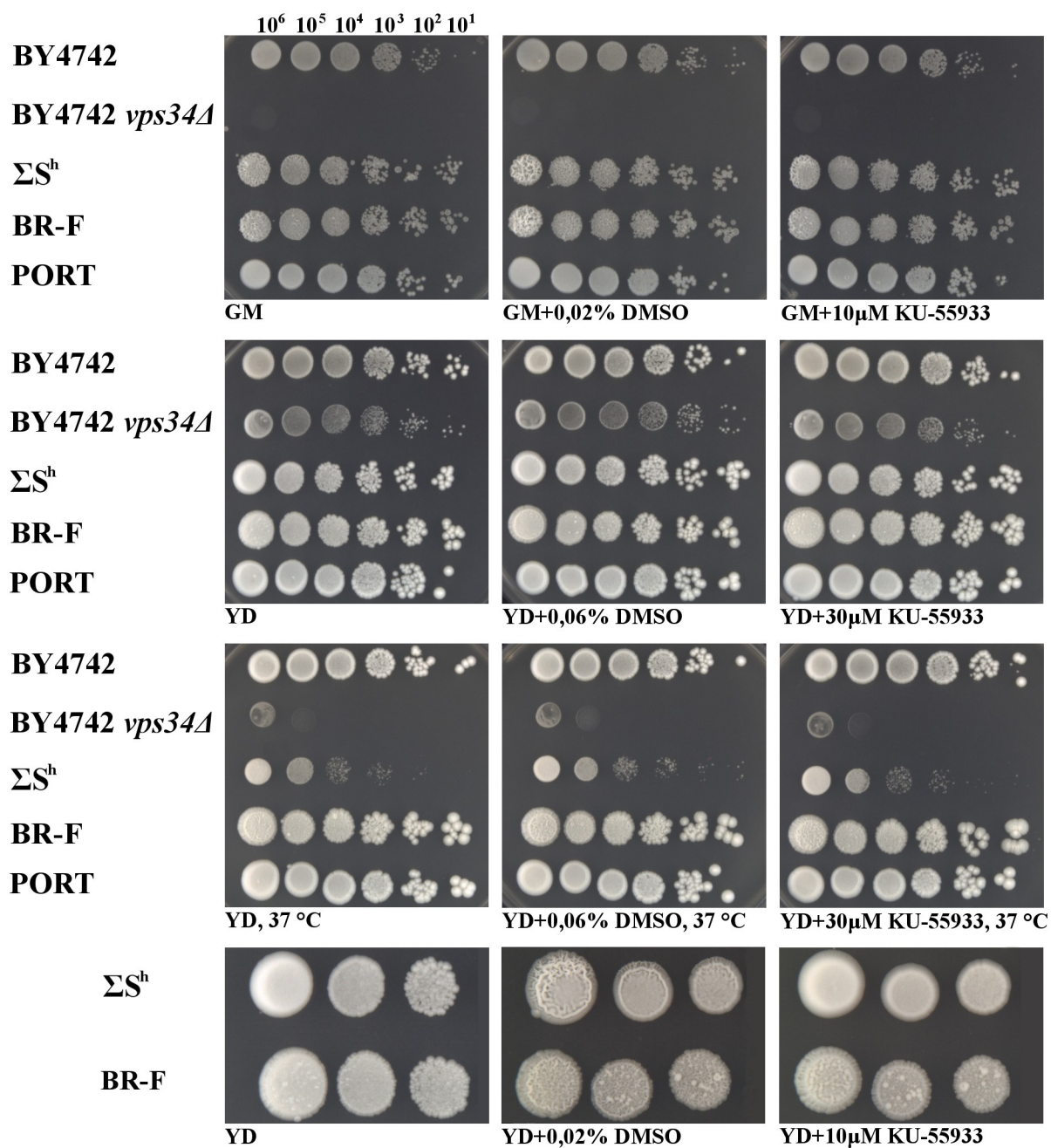
- GM+10 μ M KU-55933 (kultivace při 28 °C)
- YD+10 μ M KU-55933, nebo YD+30 μ M KU-55933 (paralelní kultivace při 28 a 37 °C)

Pokud by KU-55933 inhiboval Vps34p, buňky by neměly být schopné růstu na GM nebo při 37 °C (Robinson et al., 1988; Yoshida a Anraku, 2000). Nakapával jsem buněčné suspenze ředěné desítkovou řadou na 5 dní staré plotny (skladované při 4 °C) a růst buněk sledoval 1., 2., 3., 4., a 5. den kultivace. Nezaznamenal jsem však významné rozdíly mezi jednotlivými dny kultivace. Uvedené snímky pocházejí ze 3. dne kultivace. Pro kontrolu jsem používal plotny s GM/YD a GM/YD+0,02% DMSO, respektive YD+0,06% DMSO (KU-55933 jsem před přidáním do média rozpustil v DMSO a tyto kontroly obsahují stejné množství DMSO, jaké jsem do média přidával spolu s inhibitorem).

Výsledky kapkových testů ukazují, že mnou použité koncentrace KU-55933 nemají zřetelný vliv na aktivitu Vps34p. Schopnost růstu není snížena u žádného z testovaných rodičovských kmenů za podmínek, při kterých je růst kmene BY4742 *vps34 Δ* významně (případně zcela) inhibován (Obr. 5.11). Schopnost růstu buněk kontrolního kmene BY4742 *vps34 Δ* není při kultivaci při 28 °C ovlivněna přítomností inhibitoru KU-55933, což naznačuje, že KU-55933 neovlivňuje esenciální buněčné procesy a není pro kvasinku *S. cerevisiae* toxický. Schopnost růstu všech testovaných kmenů je stejná na GM/YD a GM/YD+0,02% DMSO, respektive YD+0,06% DMSO.

Testy rovněž prokázaly, že 0,02% DMSO v YD médiu indukuje vrásčitost kolonií u kmenů Σ S^h a BR-F. V přítomnosti 10 μ M KU-55933 je však kmen Σ S^h hladký a u kmene BR-F

je vrásčitost snížena (Obr. 5.11). Použití 0,06% DMSO indukuje vrásčitost jen mírně a pouze u kmene BR-F. Tato vrásčitost není ovlivněna přítomností 30 μ M KU-55933 (nevyobrazeno). Při kultivaci na GM+0,02% DMSO ke změnám strukturovanosti kolonií nedochází.



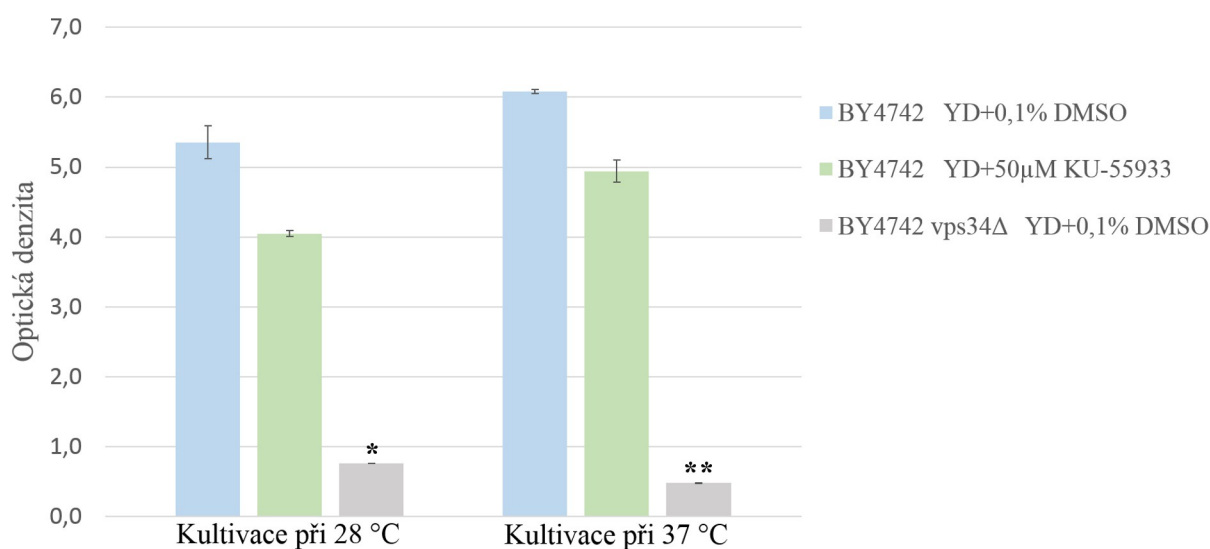
Obr 5.11: Kapkový test citlivosti buněk *S. cerevisiae* k inhibitoru KU-55933

Nakapával jsem suspenze buněk ředěné desítkovou řadou – přibližný počet buněk v jedné kapce (5 μ l) je uveden nad prvním snímkem. Spodní 3 snímky jsou výřezem makrokolonií tvořených 10⁶, 10⁵ a 10⁴ buněk. Pokud není uvedeno jinak, kultivační teplota byla 28 °C.

Protože kapkové testy inhibitoru KU-55933 neprokázaly vliv na aktivitu Vps34p, provedl jsem submerzní kultivaci v přítomnosti KU-55933, abych vyloučil, že negativní výsledek není

způsoben degradací inhibitoru v pevném médiu. Buňky kmene BY4742 jsem kultivoval paralelně v YD+50 μ M KU-55933 a v YD+0,1% DMSO při 28 °C a 37 °C. Pro srovnání jsem kultivoval také kmen BY4742 *vps34 Δ* v YD+0,1% DMSO při 28 °C a 37 °C. Kultury jsem zaočkoval na optickou denzitu (OD) 0,3 a sledoval nárůst OD po 8 hodinách kultivace na třepačce.

Schopnost růstu kultury kmene BY4742 je v přítomnosti 50 μ M KU-55933 snížena přibližně o 20 % (bez významného vlivu kultivační teploty), Obr. 5.12. Oproti tomu rychlost růstu kmene BY4742 *vps34 Δ* je ve srovnání s rodičovským kmenem snížena přibližně o 85 % při kultivaci při 28 °C a o 90 % při 37 °C. Pro malé množství inhibitoru KU-55933 jsem tento experiment provedl pouze jednou se dvěma paralelními vzorky pro každé podmínky. Statisticky signifikantní je tedy pouze rozdíl růstu mezi kmenem BY4742 a BY4742 *vps34 Δ* .



Obr. 5.12: Vliv inhibitoru KU-55933 na růst submerzní kultury

Testoval jsem schopnost růstu kmene BY4742 v přítomnosti inhibitoru KU-55933 při kultivaci při 28 °C a 37 °C po dobu 8 hodin. Pro srovnání jsem použil kmen BY4742 *vps34 Δ* . Směrodatné odchylky a hladiny statistické významnosti: <0,05 = *, <0,01 = ** určené pomocí t-testu jsou vyznačeny v grafu.

5.3 Analýzy kmenů se zvýšenou expresí *VPS34*

Cílem této části diplomové práce bylo určit, zda konstitutivní exprese *VPS34* vede k narušení PI3K signální dráhy u přírodních či laboratorních kmenů *S. cerevisiae* s nezávislým genetickým pozadím, a zda má vliv na vývoj a morfologii kolonií a buněk.

5.3.1 Příprava kmenů s konstitutivní expresí *VPS34*

Cíl: Připravit kmeny s konstitutivní expresí *VPS34* odvozené od přírodních i laboratorních kmenů *S. cerevisiae*.

Kmeny s konstitutivní expresí *VPS34* řízenou vloženým promotorem TEF jsem připravoval od přírodních diploidních kmenů BR-F, BR-F Flo11p-GFP, BR-S a PORT a od laboratorních haploidních kmenů BY4742 a ΣS^h . Buňky jsem transformoval kazetou s promotorem TEF a *kanMX*. Pozitivní klony jsem selektoval na GM+G418 a následně pomocí PCR ověřil správné vložení kazety před *VPS34*. Takto jsem připravil kmeny s konstruktem *TEF-VPS34* odvozené od všech uvedených rodičovských kmenů. I přes opakované pokusy a optimalizaci přípravy templátové DNA (různé primery, Nested PCR, různé teploty a časy jednotlivých fází PCR) se sekvenace konstruktů *TEF-VPS34* nezdařila. Funkčnost konstruktů *TEF-VPS34* jsem proto ověřil pomocí Northern blot analýzy s hybridizací.

5.3.2 Northern blot analýza s hybridizací u kmenů s konstruktem *TEF-VPS34*

Cíl: Ověřit zvýšenou expresi *VPS34* a míru exprese *VPS15* u kmenů s konstruktem *TEF-VPS34*.

Kmeny s konstruktem *TEF-VPS34*, BY4742 *vps15Δ*, BY4742 *vps34Δ*, ΣS^h *vps15Δ*, ΣS^h *Vps34p-GFP* a jejich rodičovské kmeny jsem kultivoval submerzně v YD (18 hodin, 28 °C, na třepačce). Tento experiment jsem dvakrát opakoval. Nejprve jsem izoloval celkovou RNA směsí fenol:chloroform:isoamylalkohol. Při druhém opakování jsem použil pro izolaci RNA horký fenol (viz kapitola 4.2.6). Elektroforetická analýza celkové RNA i Northern blot s hybridizací ukázaly, že RNA izolovaná horkým fenolem je méně degradovaná a obsahuje méně kontaminace DNA (nevyobrazeno). Proto jsem použil pouze data získaná analýzou RNA izolovaných horkým fenolem.

Jak je patrné z Tab. 5.8, růstová rychlost a hmotnost mokré biomasy se po 18 hodinách submerzní kultivace v YD významně liší mezi delečními a rodičovskými kmeny, ne však mezi rodičovskými kmeny a kmeny s konstruktem *TEF-VPS34*. Deleční kmeny tedy zřejmě mají vlivem svého pomalejšího růstu v době odběru více dostupných živin než rodičovské kmeny a kmeny s konstruktem *TEF-VPS34* a jsou pravděpodobně v jiné růstové fázi.

Tab. 5.8: Srovnání růstu kmenů použitých pro izolaci RNA

Přírodní kmen	OD* (1 ml)	Hmotnost biomasy (mg)	Laboratorní kmen	OD* (1 ml)	Hmotnost biomasy (mg)
BR-F	11,1	410	BY4742	9,72	300
BR-F <i>TEF-VPS34</i>	10,9	430	BY4742 <i>TEF-VPS34</i>	9,99	300
BR-F Flo11p-GFP	11,05	430	BY4742 <i>vps15Δ</i>	2,12	70
BR-F Flo11p-GFP <i>TEF-VPS34</i>	11,1	440	BY4742 <i>vps34Δ</i>	2,49	80
BR-S	11,4	450	ΣS ^h	7,05	460
BR-S <i>TEF-VPS34</i>	9,75	450	ΣS ^h <i>TEF-VPS34</i>	8,2	460
PORT	10,65	400	ΣS ^h Vps34p-GFP	4,14	220
PORT <i>TEF-VPS34</i>	12,1	370	ΣS ^h <i>vps15Δ</i>	0,57	80

* Počáteční OD bylo 0,2. Submerzní kultivace ve 40 ml YD, 18 hodin na třepačce při 28 °C.

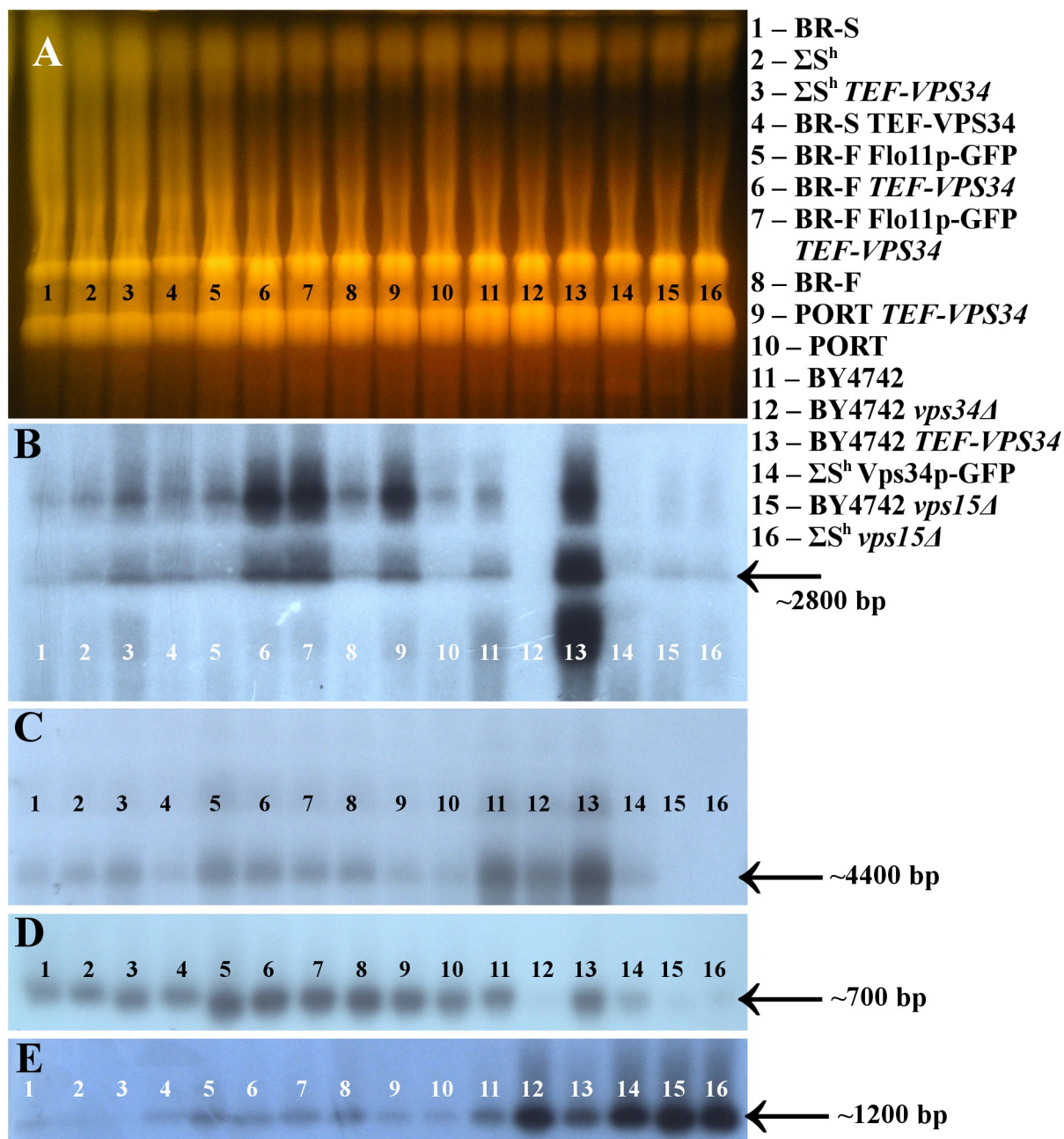
Pomocí Northern blot analýzy s následnou hybridizací s radioaktivní sondou jsem sledoval expresi *VPS34*, *VPS15*, *OPI3* a *RPL3* (Obr. 5.13). Pro přípravu sond pomocí PCR jsem použil primery nasedající v oblasti kódující sekvence uvedených genů, jejichž unikátnost v rámci genomu je ověřena. Abych mohl porovnávat expresi *VPS34* a *VPS15* mezi rodičovskými kmeny a kmeny s konstruktem *TEF-VPS34*, musel jsem ověřit, že oba kmeny jsou ve stejné růstové fázi. Proto jsem sledoval expresi *OPI3* (kóduje methyltransferázu fosfolipidů) a *RPL3* (kóduje protein L3 velké ribozomální podjednotky). Výsledky naší laboratoře ukazují, že *RPL3* je exprimován hlavně v exponenciální fázi růstu, zatímco *OPI3* spíše ve stacionární fázi růstu (nepublikováno). Protože mezi použitými rodičovskými kmeny jsou rozdíly v expresi sledovaných genů, pro porovnání jejich exprese mezi rodičovskými kmeny a kmeny s konstruktem *TEF-VPS34* jsem použil relativní exprese genů korelované na rodičovské kmeny.

Velikost mRNA *OPI3* a *RPL3* detekovaných pomocí hybridizace se sondou odpovídá očekávané velikosti (cca délka kódujících sekvencí) a výsledkem je u obou detekce jediného signálu na filmu (Obr. 5.13 D a E). V případě mRNA *VPS15* jsou signály na filmu dva, v přibližné velikosti 4400 bp a 2800 bp. Očekávanému signálu mRNA *VPS15* odpovídá signál s velikostí 4400 bp, signál o velikosti ~2800 bp je jeho zřejmě degradačním produktem.

U mRNA *VPS34* jsou na filmu patrné dva signály s přibližnou velikostí 2800 bp a 820 bp. Očekávané délce (délka kódující sekvence je 2628 bp) odpovídá signál s velikostí ~2800 bp. Signál o velikosti ~820 bp je pravděpodobně jeho degradačním produktem. U kmene BY4742 (a méně také u některých dalších kmenů) je přítomný ještě signál s větší velikostí, přibližně 6000 bp. Jeho význam není jasný.

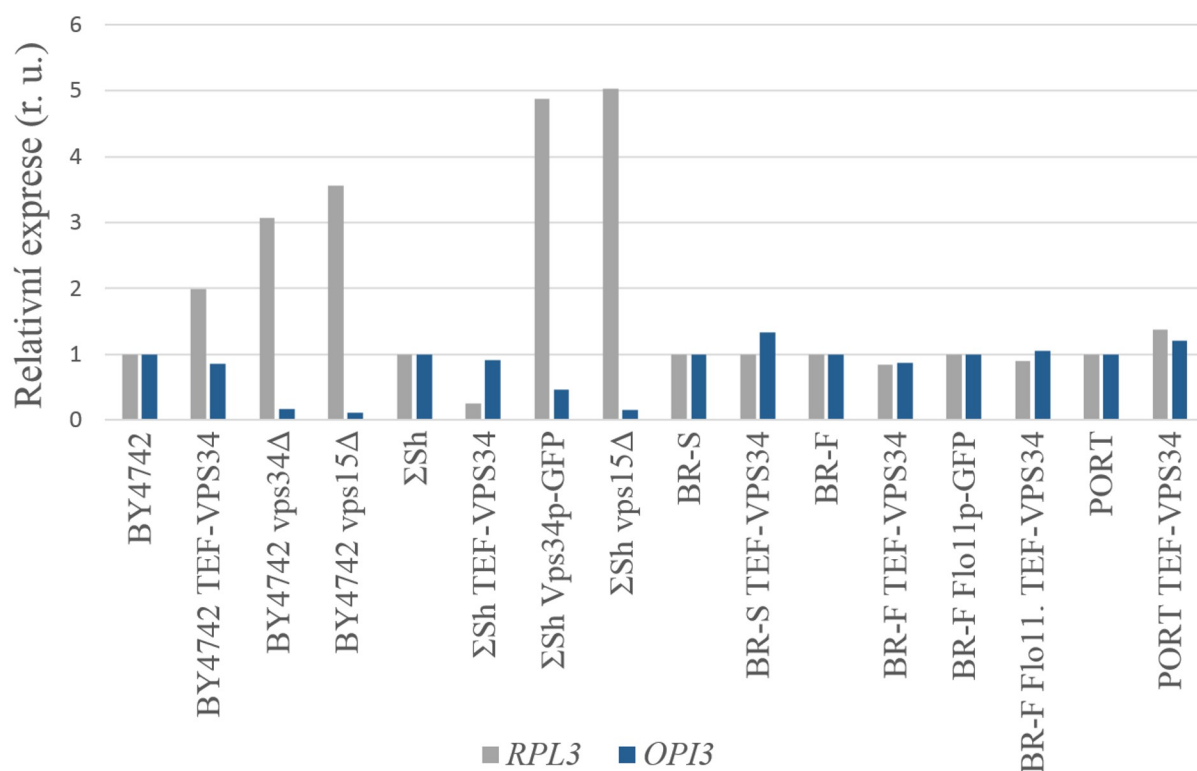
Intenzity jednotlivých signálů na filmech jsem vyhodnocoval pomocí programu ImageJ. Jak je patrné z Obr. 5.14, exprese *RPL3* a *OPI3* je u rodičovských kmenů a kmenů s konstruktem *TEF-VPS34* srovnatelná. Výjimkou jsou kmeny Σ^h *TEF-VPS34* a BY4742 *TEF-VPS34*, které mají ve srovnání s rodičovským kmenem sníženou, respektive zvýšenou expresi *RPL3*. Jejich exprese *OPI3* je však srovnatelná s rodičovským kmenem. Oproti tomu kmeny Σ^h *Vps34p-GFP*, Σ^h *vps15Δ*, BY4742 *vps15Δ*, BY4742 *vps34Δ* mají výrazně zvýšenou expresi *RPL3* (~3-5×) a naopak významně sníženou expresi *OPI3* (~2-4×), což svědčí o exponenciální fázi růstu těchto kmenů. Jak vyplývá z Tab. 5.8, tyto kmeny mají nižší růstovou rychlost a v době odběru nebyl růst kultury limitován nedostatkem živin v médiu.

Z Obr. 5.15 je zřejmé, že exprese *VPS34* u kmenů s konstruktem *TEF-VPS34* je ve srovnání s rodičovskými kmeny významně zvýšena (~2-6×). Výjimkou je kmen Σ^h *TEF-VPS34*, který má expresi *VPS34* zvýšenou oproti rodičovskému kmeni pouze přibližně o 40%. U kmenů Σ^h *Vps34p-GFP*, Σ^h *vps15Δ* a BY4742 *vps15Δ* je exprese *VPS34* při porovnání s rodičovskými kmeny významně snížena (~2-3×). Tyto kmeny mají rovněž významně sníženou expresi *VPS15* (~2-3×). Kmeny s konstruktem *TEF-VPS34* mají expresi *VPS15* srovnatelnou s rodičovskými kmeny. Výjimkou je kmen *PORT TEF-VPS34*, jehož exprese *VPS15* je významně zvýšena (>2×).



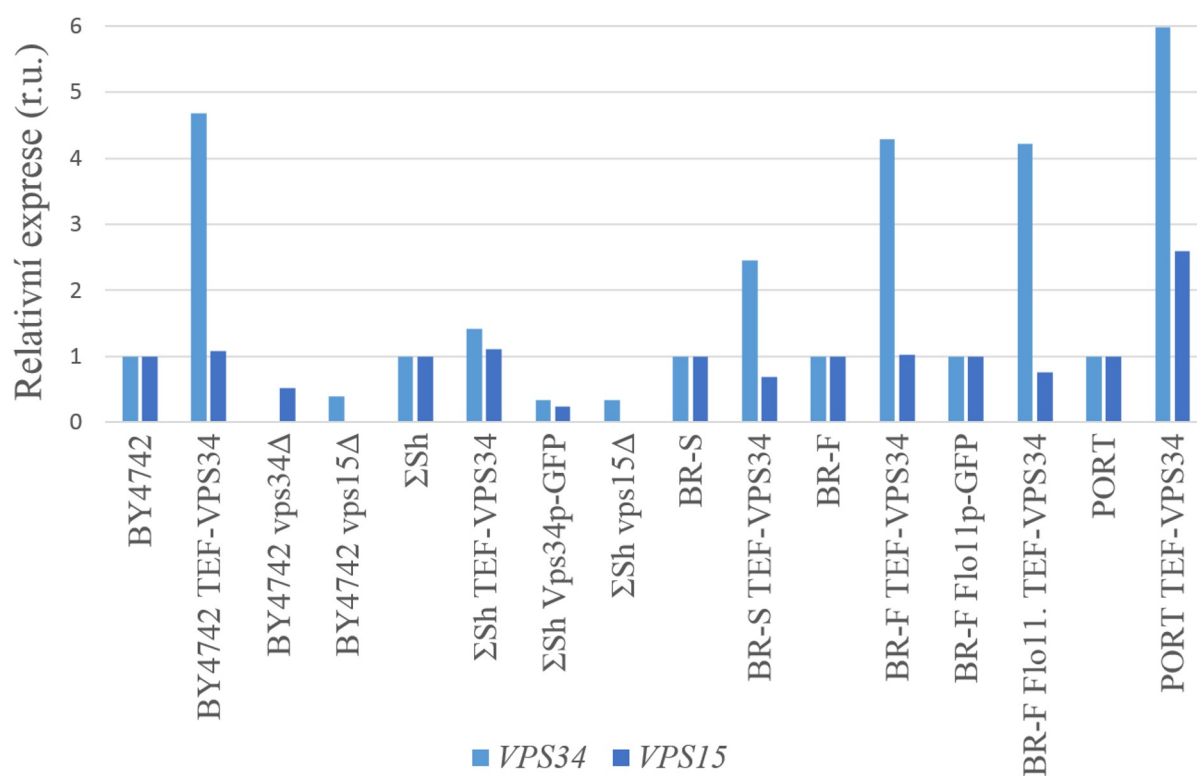
Obr. 5.13: Northern blot analýza kmenů s konstruktem *TEF-VPS34*

A – elektroforetická analýza celkové RNA. 18S rRNA (1798 nt) a 25S rRNA (3392 nt) jsou dobře rozdělené. Vzorky 1-4 jsou i přes stejnou nanášku slabší, zřejmě jsou mírně degradované. B – výsledek hybridizace membrány po Northern blotu se sondou proti *VPS34* (primery *VPS34* E + *VPS34* F, 5 dní expozice), velikost kódující sekvence 2628 bp. C – výsledek hybridizace membrány po Northern blotu se sondou proti *VPS15* (primery *VPS15* E + *VPS15* F, 7 dní expozice), velikost kódující sekvence 4365 bp. D – výsledek hybridizace membrány po Northern blotu se sondou proti *OPI3* (primery *OPI3* Fw + *OPI3* R, 2 dny expozice), velikost kódující sekvence 621 bp. E – výsledek hybridizace membrány po Northern blotu se sondou proti *RPL3* (primery *RPL3* Fw + *RPL3* R, 2 dny expozice), velikost kódující sekvence 1164 bp.



Obr. 5.14: Relativní exprese genů *RPL3* a *OPI3* korelované na rodičovské kmeny

Data vycházejí z porovnání intenzit signálů po hybridizaci membrány se sondou, viz Obr. 5.13 D a E. Kmen BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* je označen jako BR-F Flo11. *TEF-VPS34*.



Obr. 5.15: Relativní exprese genů *VPS34* a *VPS15* korelované na rodičovské kmeny

Data vycházejí z porovnání intenzit signálů po hybridizaci membrány se sondou, viz Obr. 5.13 B a C. Kmen BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* je označen jako BR-F Flo11. *TEF-VPS34*.

5.3.3 Morfologická analýza kolonií kmenů s konstruktem *TEF-VPS34*

Cíl: Porovnat morfologii a vývoj kolonií připravených kmenů s konstruktem *TEF-VPS34* odvozených od přírodních i laboratorních kmenů.

Narušení PI3K signální dráhy delecí *VPS15*, nebo *VPS34* má významný vliv na vývoj kolonií a na jejich morfologii. Zajímalo mě proto, zda zvýšená exprese *VPS34* vede ke změnám v morfologii kolonií ve srovnání s rodičovskými kmeny.

První testy všech připravených kmenů s konstruktem *TEF-VPS34* a jejich rodičovských kmenů neprokázaly změny morfologie kolonií při kultivaci na GM (nevyobrazeno). Pro podrobnější analýzu jsem zvolil kmeny *TEF-VPS34* odvozené od BY4742, BR-F, BR-S a PORT.

Kmen BY4742 i kmen BY4742 *TEF-VPS34* mají stejnou morfologii při kultivaci na YD (nepravidelné okraje a zvýšený střed kolonie). K zarůstání do agaru nedochází ani u jednoho kmene (nevyobrazeno). Morfologie buněk jsou u obou kmenů shodné (Obr. 5.16). Průměrná plocha kolonií je u kmene s konstitutivní expresí *VPS34* a u rodičovského kmene obdobná (Tab. 5.9).

Tab. 5.9: Průměrná plocha pětidenních kolonií kmenů BY4742 a BY4742 *TEF-VPS34* rostoucích na YD

Kmen	Celkový počet kolonií	Průměrný počet kolonií na misce	Průměrná plocha kolonie (mm ²)	Směrodatná odchylka (mm ²)
BY4742	559	80	7,4	1,0
BY4742 <i>TEF-VPS34</i>	693	99	7,0	1,0

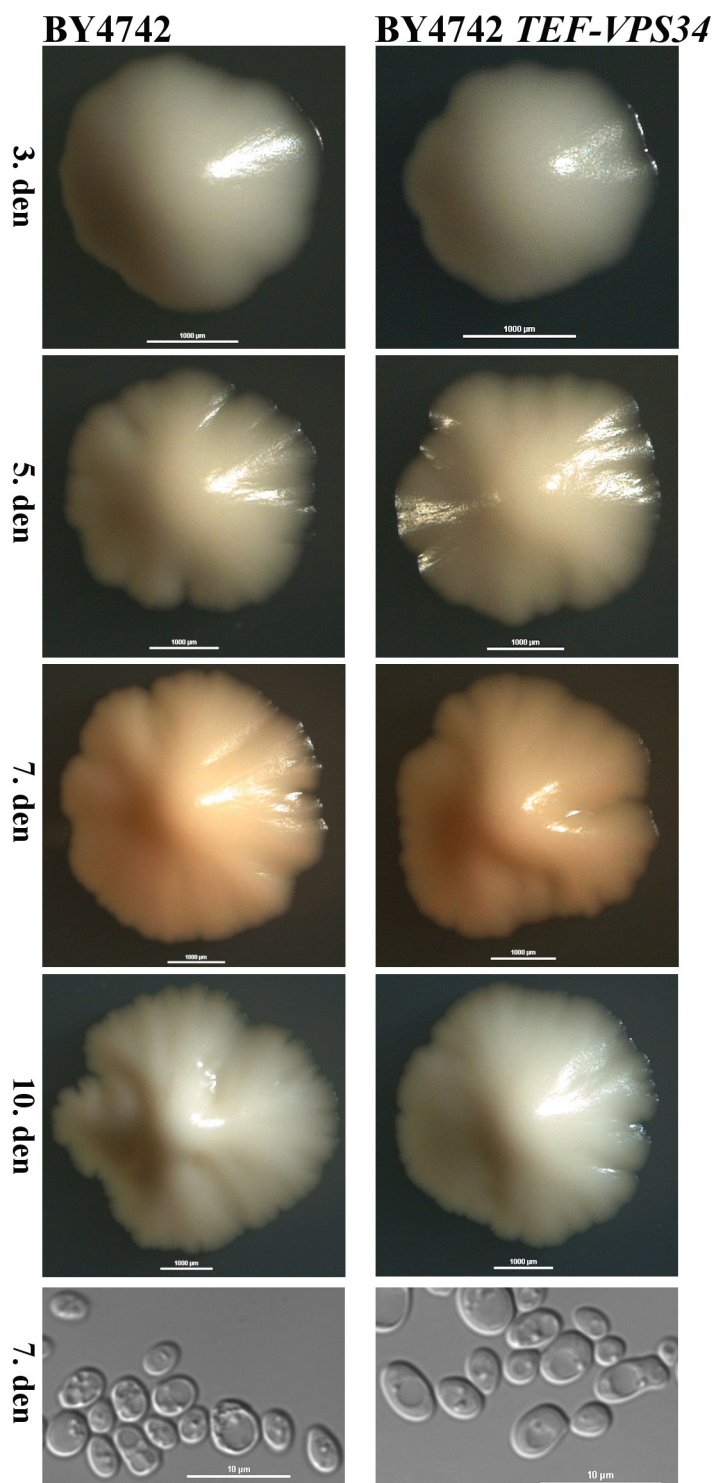
Hladiny statistické významnosti: <0,05 = *, <0,01 = **, <0,001 = *** určené pomocí t-testu. Pro výpočet průměrné plochy kolonie jsem použil nejméně 7 misek od každého kmene.

Kmen BR-F vytváří na YD kolonie s mírně vrásčitými okraji a strukturovaným středem. BR-F *TEF-VPS34* vytváří na YD kolonie s podobnou morfologií jako rodič, centrální část kolonií je však méně strukturovaná (Obr. 5.17). U obou kmenů dochází na okrajích kolonií k tvorbě ohraničených hladkých oblastí. Při kultivaci na GM vytvářejí oba kmeny strukturované kolonie, kmen BR-F *TEF-VPS34* má však větší plochu okrajů než rodičovský kmen. Schopnost zarůstání do agaru a morfologie buněk jsou u obou kmenů shodné.

Kmen BR-S i kmen BR-S *TEF-VPS34* mají stejnou morfologii při kultivaci na YD (hladké okraje, zvýšený střed kolonií) i na GM (hladké, spíše ploché kolonie), Obr. 5.18. Schopnost zarůstání do agaru a morfologie buněk jsou u obou kmenů shodné.

Kmen PORT i kmen PORT *TEF-VPS34* mají stejnou morfologii při kultivaci na YD (hladké okraje, zvýšený střed kolonií) i na GM (mírně vrásčité kolonie, zvýšený střed kolonií),

Obr. 5.19. Při kultivaci na YD je 10. den patrný invazivní růst na okrajích kolonií, zvláště u kmene PORT *TEF-VPS34*. Zarůstání do agaru (na YD i GM) se u tohoto kmene zdá rovněž výraznější než u rodičovského kmene. Morfologie buněk jsou u obou kmenů shodné.

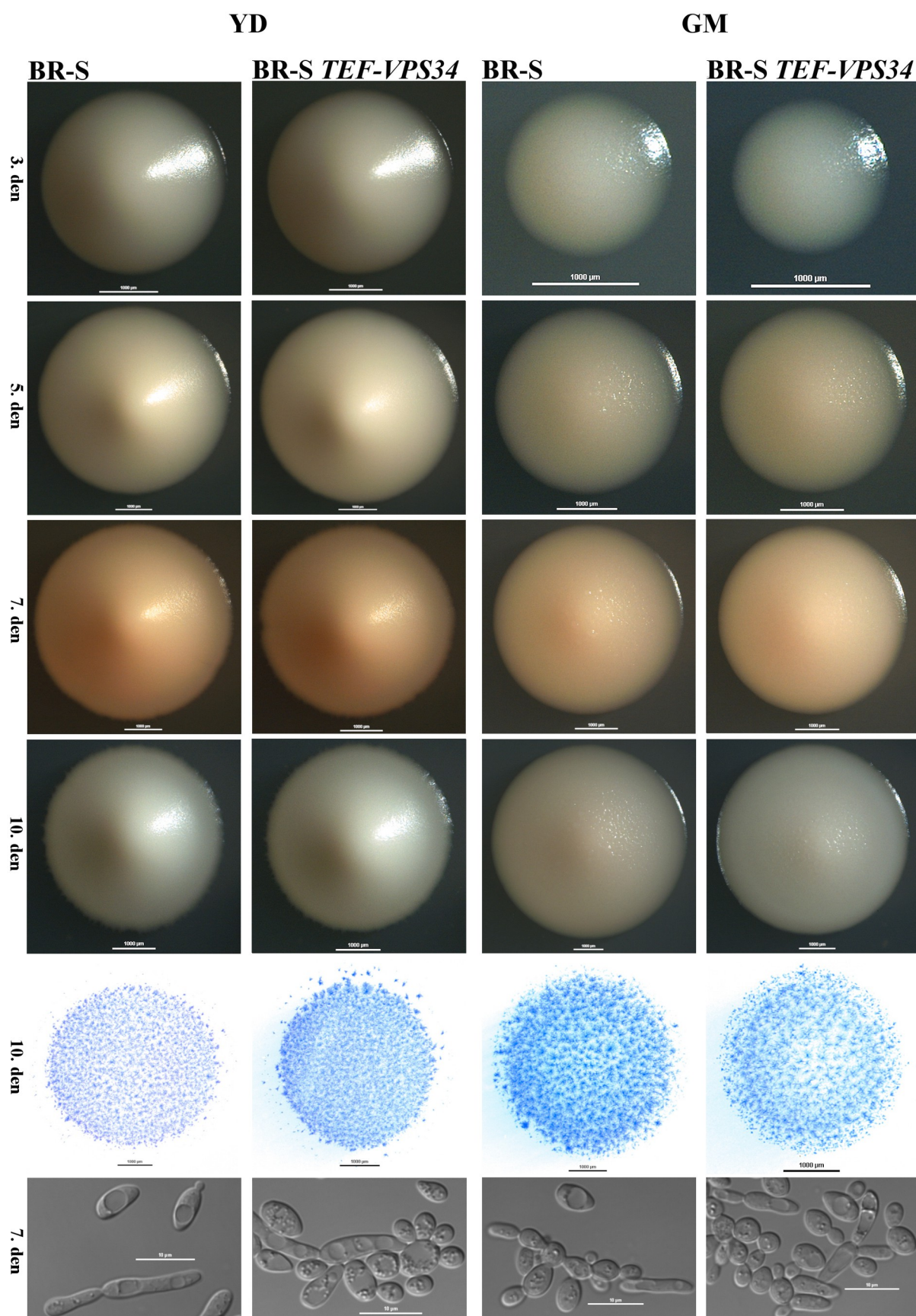


Obr. 5.16: Morfologická analýza kmene BY4742 *TEF-VPS34* v porovnání s rodičovským kmenem

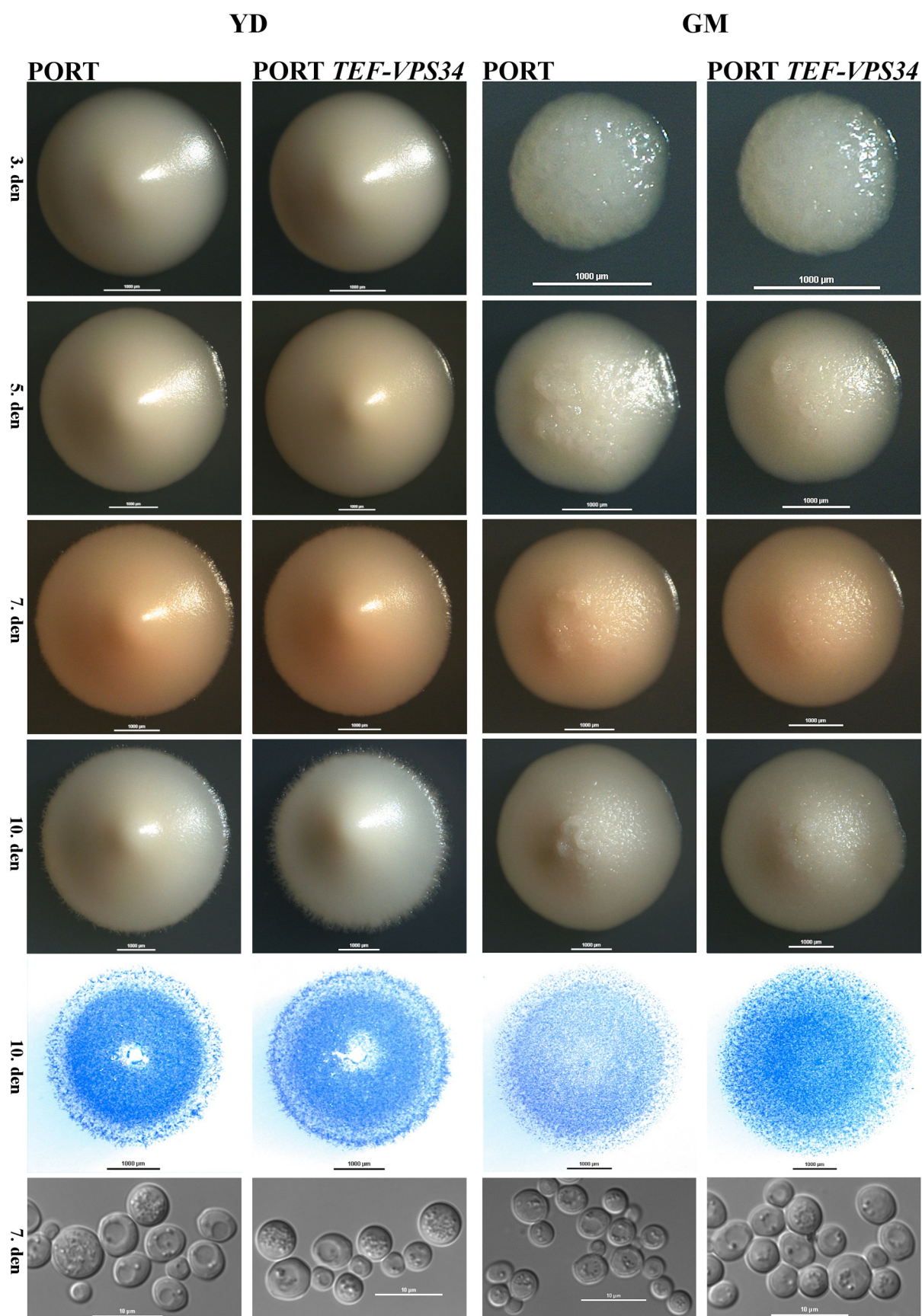
Morfologii kolonií jsem sledoval při kultivaci na YD 3., 5., 7. a 10. den (měřítko 1 mm). Buňky pocházejí ze sedmidenních kolonií (měřítko 10 µm).



Obr. 5.17: Morfologická analýza kmene BR-F *TEF-VPS34* v porovnání s rodičovským kmenem
Morfologii kolonií jsem sledoval při kultivaci na YD a GM 3., 5., 7. a 10. den (měřítko 1 mm). Buňky pocházejí ze sedmidenních kolonií (měřítko 10 µm). Modré stopy kolonií ukazují invazivní růst (10 den, měřítko 1 mm).



Obr. 5.18: Morfologická analýza kmene BR-S *TEF-VPS34* v porovnání s rodičovským kmenem
Morfologii kolonií jsem sledoval při kultivaci na YD a GM 3., 5., 7. a 10. den (měřítko 1 mm). Buňky pocházejí ze sedmidenních kolonií (měřítko 10 μ m). Modré stopy kolonií ukazují invazivní růst (10 den, měřítko 1 mm).



Obr. 5.19: Morfologická analýza kmene PORT *TEF-VPS34* v porovnání s rodičovským kmenem
Morfologii kolonií jsem sledoval při kultivaci na YD a GM 3., 5., 7. a 10. den (měřítko 1 mm). Buňky pocházejí ze sedmidenních kolonií (měřítko 10 μm). Modré stopy kolonií ukazují invazivní růst (10 den, měřítko 1 mm).

5.3.4 Citlivost kmenů *TEF-VPS34* k inhibitorům

Cíl: Sledovat vliv konstitutivní exprese *VPS34* na fitness kolonie v přítomnosti inhibitoru.

Vliv inhibitorů na růst buněk jsem určoval pomocí kapkových testů, kdy jsem sledoval, jaké množství buněk je schopné růstu, viz kapitola 5.2.5. Růst kolonií jsem pozoroval 3., 5. a 7. den. Nezaznamenal jsem však významné rozdíly mezi jednotlivými dny kultivace. Uvedené snímky pocházejí ze 7. dne kultivace.

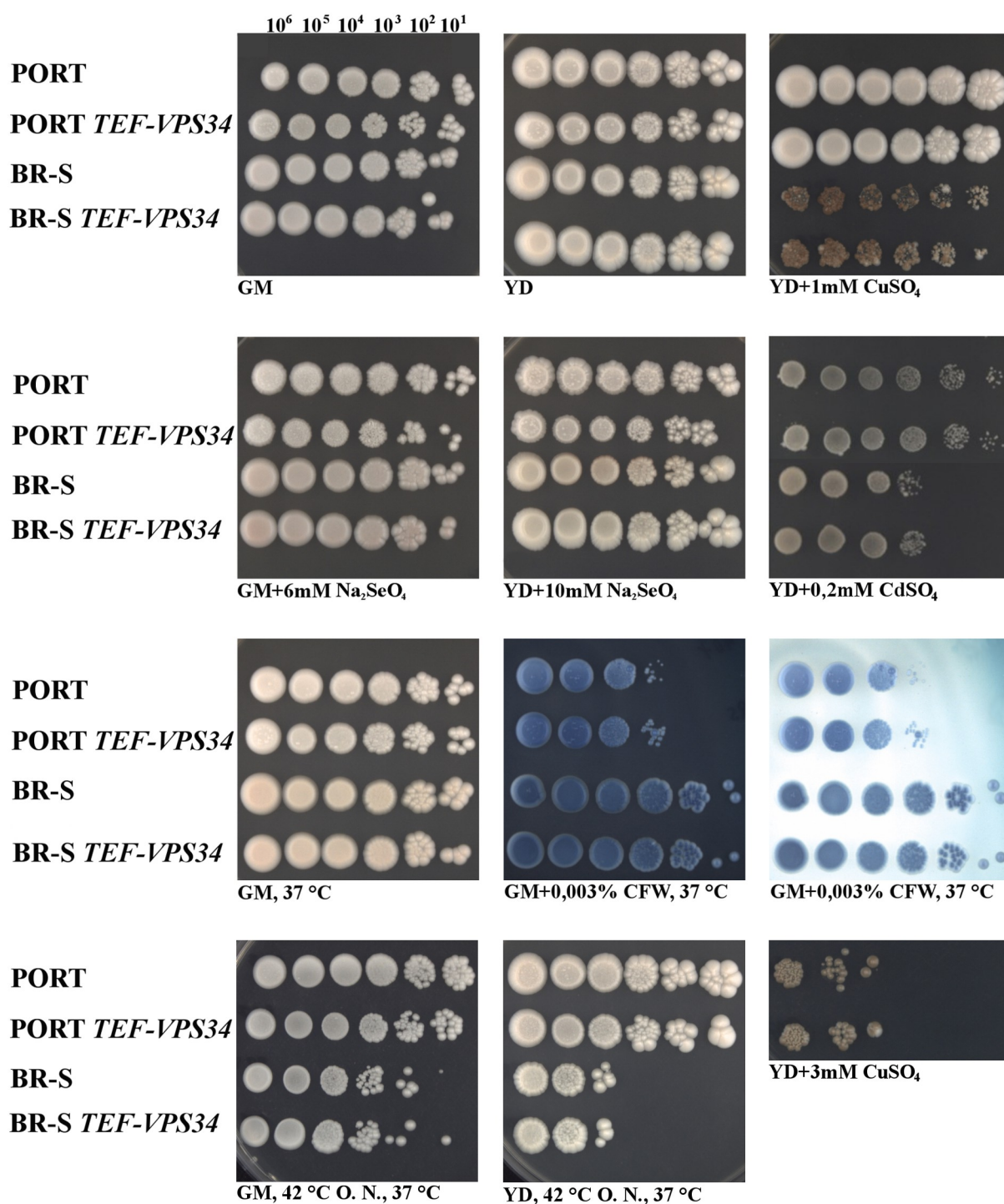
Kapkové testy kmenů s konstitutivní expresí *VPS34* odvozené od přírodních kmenů BR-F, BR-F Flo11p-GFP, BR-S a PORT a od laboratorních kmenů BY4742 a Σ^h neprokázaly významný vliv zvýšené exprese *VPS34* na vyšší odolnost vůči testovaným inhibitorům ve srovnání s rodičovskými kmeny (Obr. 5.20 a Obr. 5.21, testy kmenů odvozených od BR-F a BR-F Flo11p-GFP nejsou vyobrazeny).

Kmen PORT *TEF-VPS34* má mírně inhibovaný růst při kultivaci na YD+10mM Na_2SeO_4 a při kultivaci na GM+0,003% CFW (Calcofluor White Stain) akumuluje více CFW než rodičovský kmen.

Kmen BR-S má při kultivaci na YD+10mM Na_2SeO_4 načervenalé okraje kolonií, což je zřejmě způsobeno akumulací Na_2SeO_4 . Kmen BR-S *TEF-VPS34* okraje červené nemá.

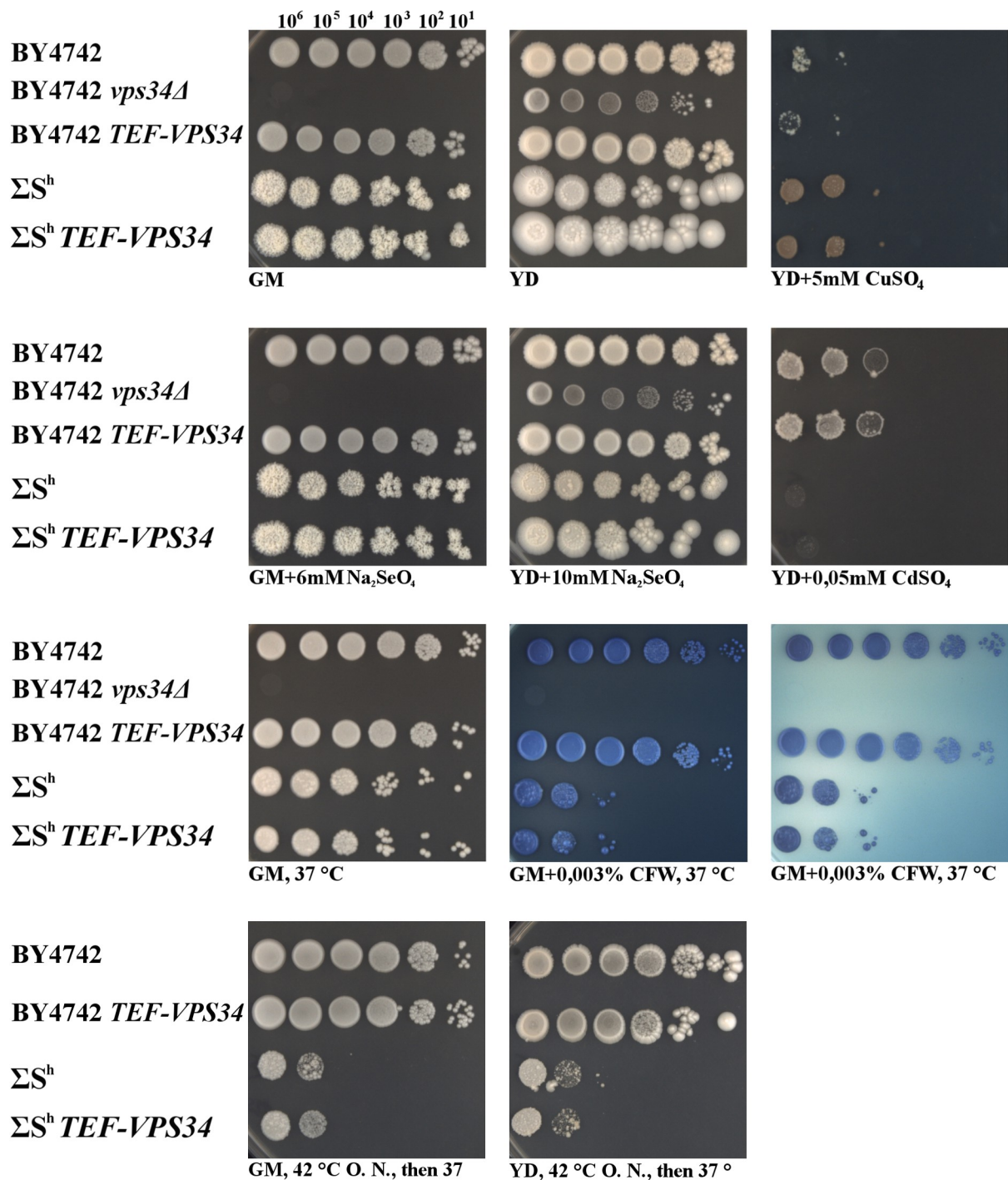
Kmen BY4742 *TEF-VPS34* při kultivaci na GM+0,003% CFW akumuluje méně CFW než rodičovský kmen.

Dobře patrné jsou však rozdíly v citlivostech k některým inhibitorům mezi jednotlivými rodičovskými kmeny. Kmen PORT je odolnější než kmen BR-S při kultivaci na YD+1mM CuSO_4 , YD+0,2 mM CdSO_4 a na YD, 42 °C O. N., 37 °C. Na druhou stranu je citlivější než BR-S při kultivaci na GM+0,003% CFW. Kmen BY4742 je odolnější než kmen Σ^h při kultivaci na YD+0,05 mM CdSO_4 ; GM, 42 °C O. N., 37 °C; YD, 42 °C O. N., 37 °C a na GM+0,003% CFW. Oproti tomu je citlivější než kmen Σ^h při kultivaci na YD+5 mM CuSO_4 .



Obr 5.20: Kapkové testy kmenů odvozených od rodičovských kmenů PORT a BR-S

Nakapával jsem suspenze buněk ředěné desítkovou řadou – přibližný počet buněk v jedné kapce (5 μ l) je uveden nad prvním snímkem. Pokud není uvedeno jinak, kultivační teplota byla 28 °C. CFW – Calcofluor White Stain. Označení 42 °C O. N., 37 °C znamená nejprve inkubaci při 42 °C přes noc, poté kultivaci při 37 °C.



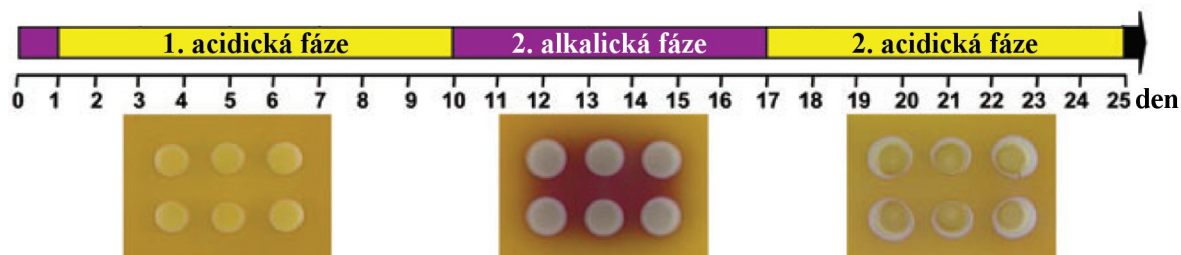
Obr 5.21: Kapkové testy kmenů odvozených od rodičovských kmenů BY4742 nebo ΣS^h

Nakapával jsem suspenze buněk ředěné desítkovou řadou – přibližný počet buněk v jedné kapce (5 μl) je uveden nad prvním snímkem. Pokud není uvedeno jinak, kultivační teplota byla 28 °C. Kmen BY4742 *vps34Δ* jsem netestoval na YD+5mM CuSO₄ a na YD+0,05mM CdSO₄. CFW – Calcofluor White Stain. Označení 42 °C O. N., 37 °C znamená nejprve inkubaci při 42 °C přes noc, poté kultivaci při 37 °C.

5.3.5 Amoniaková signalizace u kmenů *TEF-VPS34*

Cíl: Sledovat vývoj makrokolonií kmenů se zvýšenou expresí *VPS34* a její vliv na amoniakovou signalizaci.

V průběhu vývoje makrokolonií kvasinky *S. cerevisiae* dochází v důsledku produkce amoniaku k alkalizaci okolního média (*Palková et al., 1997*), viz Obr. 5.22.



Obr. 5.22: Změny pH média (GM+BKP) v průběhu vývoje makrokolonií kmene BY4742
Adaptováno z Váchová *et al.*, 2009.

Sledoval jsem, zda zvýšená exprese *VPS34* ovlivňuje načasování amoniakové signalizace a morfologii makrokolonií. Změny pH kultivačního média jsem sledoval při růstu na GM pomocí indikátoru pH – 0,01% (w/v) bromkresolpurpur (BKP) 5., 7., 9., 11., 15., 20. a 30. den u kmene BY4742 a 3., 5., 7., 10., 15., 20. a 30. den u kmene BR-F.

Bohužel nebylo možné tímto způsobem otestovat také kmeny BY4742 *vps15Δ* a BY4742 *vps34Δ*, protože nejsou schopné růstu na GM.

BY4742

Druhá alkalická fáze začala u rodičovského kmene i u kmene BY4742 *TEF-VPS34* již 5. den kultivace (Obr. 5.23). Také druhá acidická fáze začala dříve, již 13. den kultivace. Mezi testovanými kmeny však není rozdíl v načasování jednotlivých fází. Morfologie makrokolonií kmene BY4742 je spíše hladká, kmen BY4742 *TEF-VPS34* má na svém povrchu četné papily. Podle vysráženého BKP mezi centrálními koloniemi kmene BY4742 *TEF-VPS34* lze usuzovat, že tento kmen produkuje více amoniaku než kmen rodičovský. Bylo by vhodné tuto hypotézu ověřit přesnější metodou.

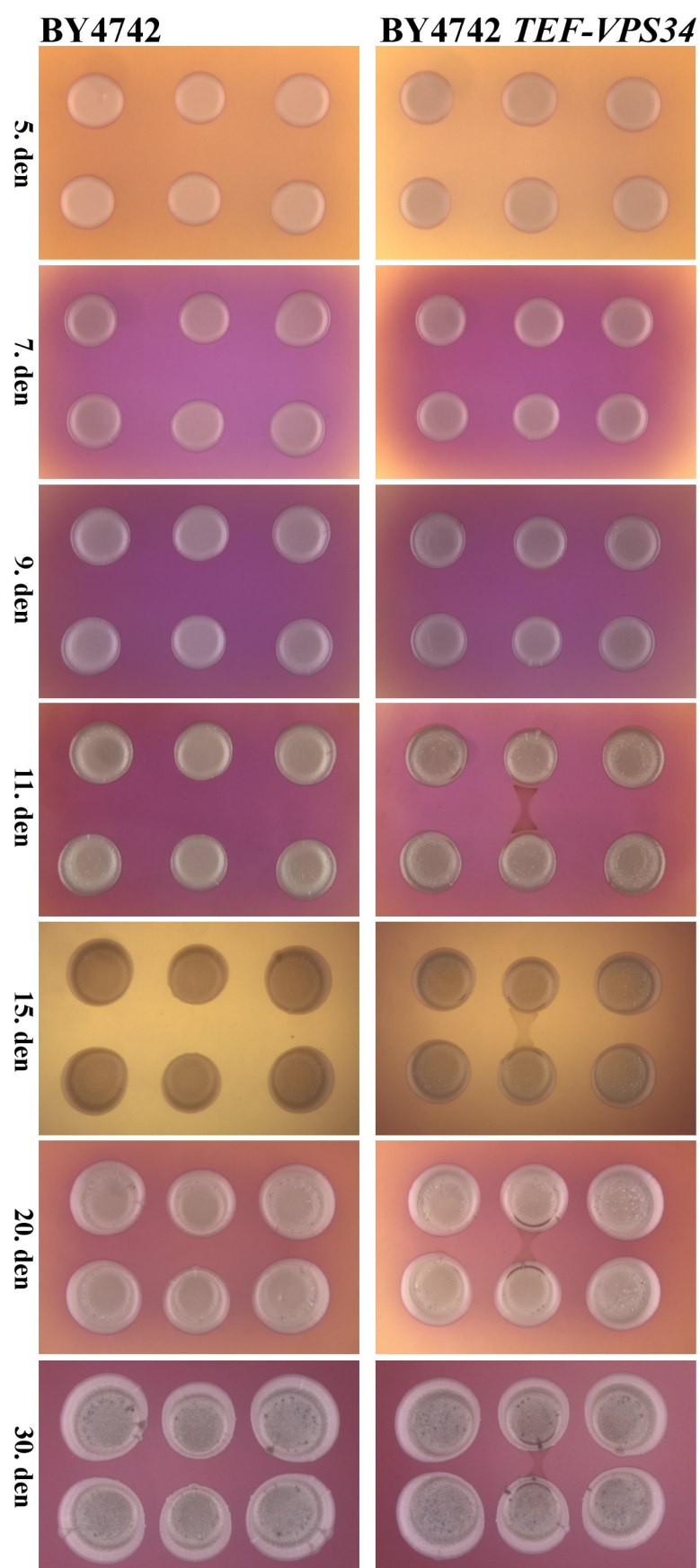
BR-F

Druhá alkalická fáze je u rodičovského kmene i u kmene BR-F *TEF-VPS34* slabě patrná 5.-7. den kultivace (Obr. 5.24). Druhá acidická fáze trvá od 10. dne kultivace a oproti kmeni BY4742 nepřechází ve třetí alkalickou fázi. Mezi kmeny BR-F a BR-F *TEF-VPS34* není rozdíl v načasování jednotlivých fází.

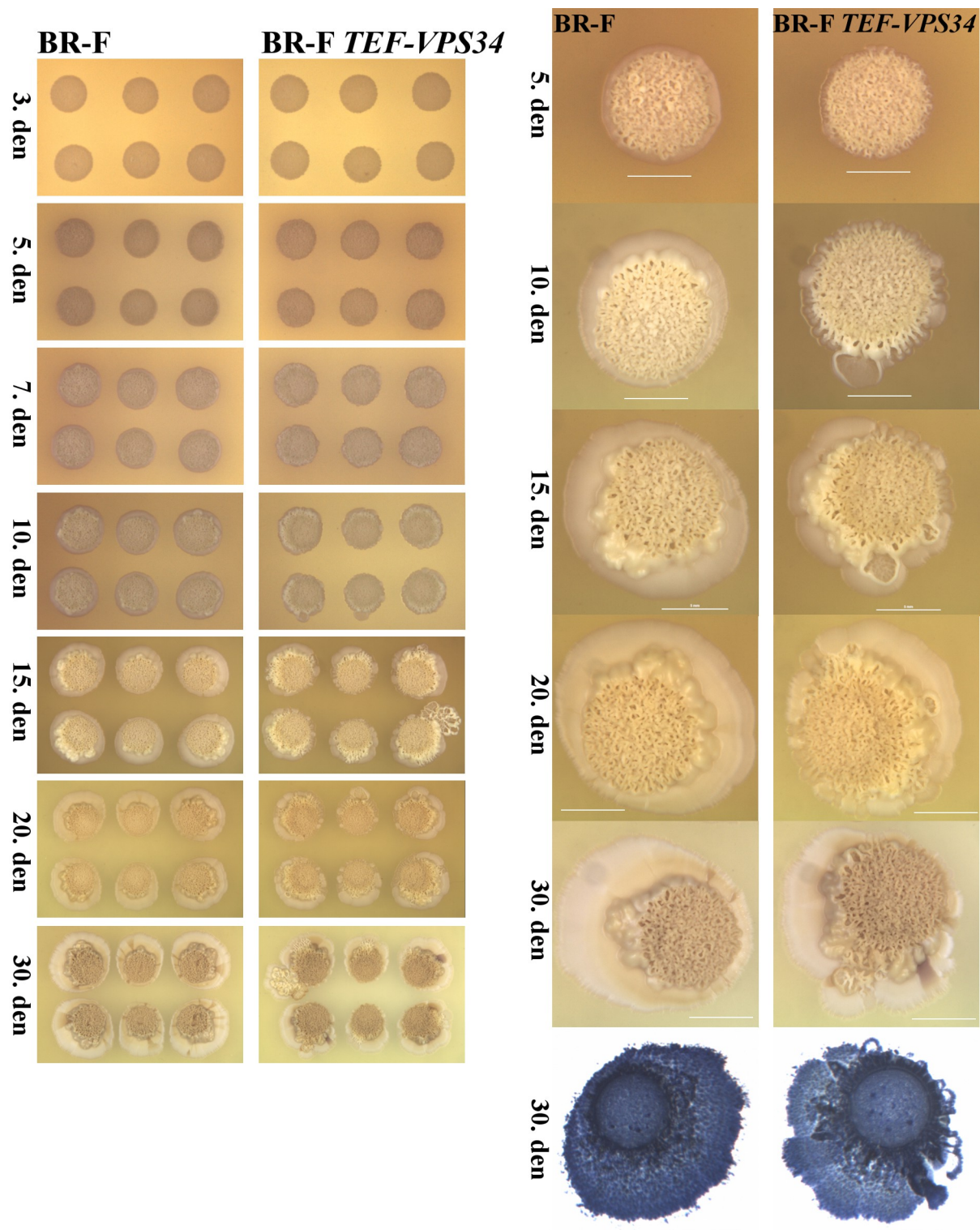
Makrokolonie BR-F a BR-F *TEF-VPS34* se výrazně liší svojí morfologií. Od 5. dne kultivace je u kmene BR-F patrný hladký okraj kolonie, který se zvětšuje s délkou kultivace. Oproti tomu kmen BR-F *TEF-VPS34* má okraj menší, hladký, ale s oblastmi, které jsou strukturované. Také schopnost zarůstání do agarů je u obou kmenů odlišná.

Abych ověřil, že rozdíl v morfologii makrokolonií kmenů BR-F a BR-F *TEF-VPS34* je charakteristický pro dané kmeny a není způsoben kultivací na GM+BKP, kultivoval jsem makrokolonie obou kmenů na GM s jiným kvasničným autolyzátem (šarže č. 904149, AES Laboratoire) – Obr. 5.25. Při kultivaci na tomto médiu nejsou centrální části kolonií tak výrazně strukturované jako na GM+BKP. Rozdíl v morfologii okrajů kolonií je však i zde dobře viditelný. Také schopnost zarůstání do agarů je u obou kmenů odlišná – kmen BR-F *TEF-VPS34* zřejmě invaduje do agarů ochotněji než rodičovský kmen. Centrální část kolonií vykazuje stejnou schopnost zarůstání do agarů o obou kmenů. U kmene BR-F *TEF-VPS34* jsou však patrné větší oblasti okrajů, které invadují do agarů více než zbylé části okrajů. Při porovnání s fotografiemi morfologie makrokolonií se zdá, že tyto oblasti jsou oblastmi okrajů, které nejsou hladké, ale strukturované. To odpovídá rozdílu mezi tímto kmenem a rodičovským kmenem, který má celé okraje hladké.

Kromě morfologie makrokolonií a schopnosti zarůstání do agarů jsem sledoval také morfologie buněk odebraných z centrální části a z okrajů kolonie (5., 10. a 15. den kultivace) (Obr. 5.24). Nezaznamenal jsem rozdíl mezi kmenem BR-F *TEF-VPS34* a rodičovským kmenem. Je však patrný rozdíl v morfologii buněk z centrální části a z okraje kolonií. Buňky z okrajů kolonií jsou častěji protáhlé než buňky z centrální části kolonií, což svědčí o filamentárním růstu. Oproti tomu buňky z centrální části kolonií jsou spíše kulaté, protáhlé buňky jsou přítomny jen v minimálním množství.

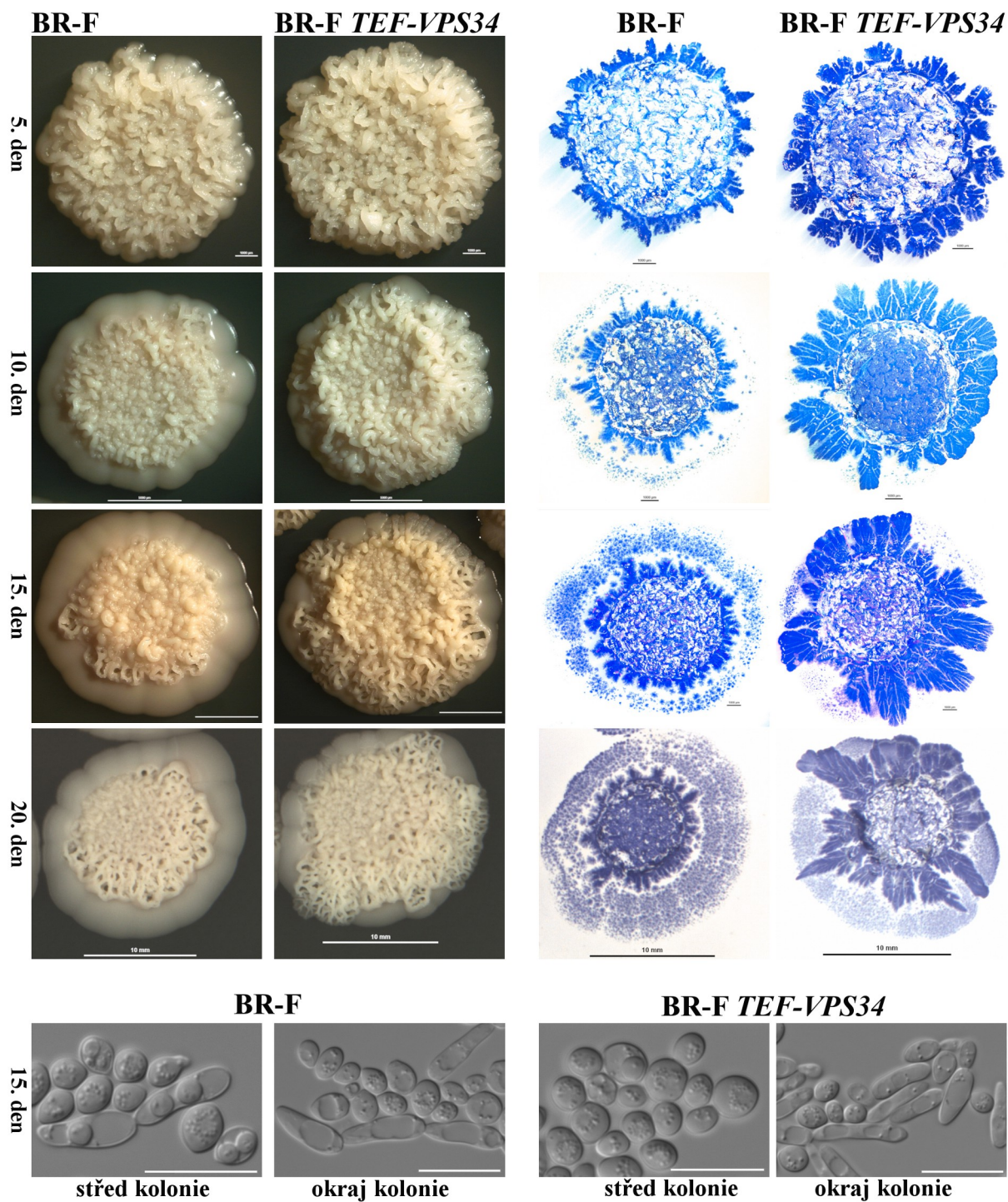


Obr. 5.23: Amoniaková signalizace kmenů BY4742 a BY4742 *TEF-VPS34*
Kultivace na GM+BKP.



Obr. 5.24: Amoniaková signalizace kmenů BR-F a BR-F *TEF-VPS34*

V levé části jsou vyobrazeny změny pH (barvy) média v průběhu kultivace. Vpravo jsou vyobrazeny morfologie makrokolonií a schopnost zarůstání do agaru. Kultivace na GM+BKP. Měřítka je 5 mm.



Obr. 5.25: Srovnání morfologie kolonií a buněk a zarůstání do agaru u kmenů BR-F a BR-F *TEF-VPS34*

Morfologii makrokolonií jsem sledoval při kultivaci na GM s kvasničným autolyzátem (šarže č. 904149, AES Laboratoire) 5. den (měřítko 1 mm), 10. den (měřítko 5 mm), 15. a 20. den (měřítko 10 mm). Buňky pocházejí z patnáctidenních kolonií – z centrální části, nebo z okraje kolonie (měřítko 10 μm). Modré stopy kolonií ukazují schopnost invazivního růstu daného kmene (5., 10. a 15. den, měřítko 1 mm; 20. den, měřítko 10 mm).

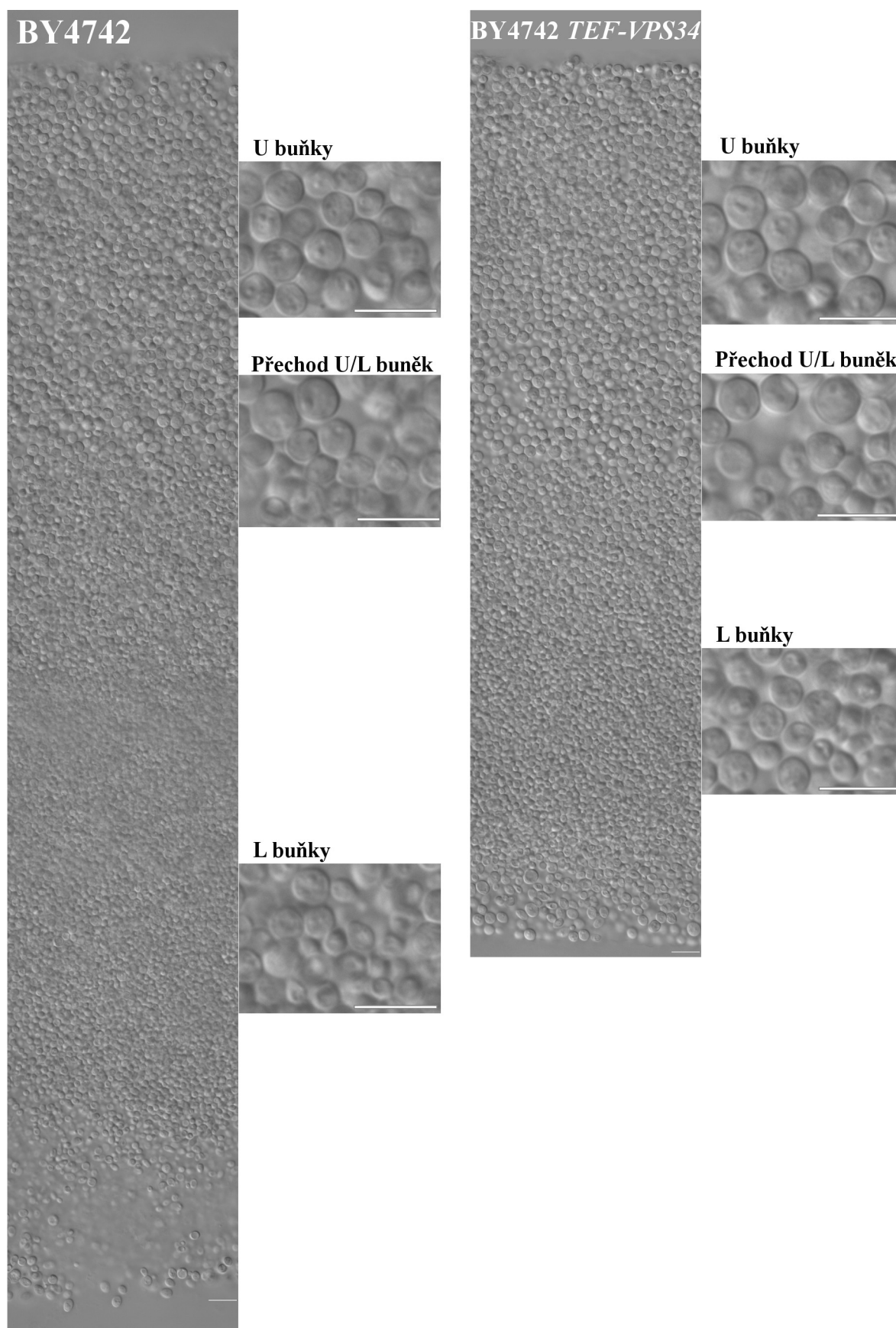
5.3.6 Vertikální diferenciaci makrokolonií u kmene BY4742 *TEF-VPS34*

Cíl: Porovnat schopnost vertikální diferenciaci v centrální části makrokolonií u rodičovského kmene BY4742 a kmene BY4742 *TEF-VPS34*.

Makrokolonie laboratorního kmene BY4742 v průběhu růstu diferencují na dvě základní buněčné populace – horní buňky (U z angl. *upper*, svrchní část kolonií) a spodní buňky (L z angl. *lower*, v blízkosti média), které se od sebe významně liší svojí morfologií i fyziologií. Mezi oběma vrstvami je ostrý přechod, U a L buňky se spolu nemísí. Tato diferenciaci je dokončena kolem 10. dne kultivace (Čáp *et al.*, 2012).

Schopnost diferenciaci makrokolonií jsem pozoroval u krajních kolonií 11. den po nakapání na GM+BKP pomocí mikroskopie tenkých řezů. Tento experiment jsem opakoval dvakrát se shodnými výsledky.

U kmene BY4742 *TEF-VPS34* nedochází ke změně diferenciaci makrokolonií (Obr. 5.26). Horní i spodní buňky jsou morfologicky odlišné a mezi oběma typy je ostré rozhraní podobně jako u rodičovského kmene. Rozdíl výšky kolonií mezi sledovanými kmeny je zřejmě způsoben odklonem od kolmé osy při řezání makrokolonií na mikrotomu.



Obr. 5.26: Vertikální diferenciace centrální části makrokolonií BY4742 a BY4742 *TEF-VPS34*. Řezy pocházejí z 11 dní starých makrokolonií kultivovaných na GM+BKP. Měřítka je 10 µm.

5.3.7. Analýza produkce a lokalizace Flo11p-GFP u kmene BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34*

Cíl: Sledovat, zda u kmene BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* dochází ke změnám v expresi nebo lokalizaci Flo11p-GFP oproti rodičovskému kmeni.

Pro tvorbu strukturovaných kvasinkových kolonií je nezbytný povrchový glykoprotein Flo11p (Šťovíček *et al.*, 2010). Zajímalo mne, zda konstitutivní exprese *VPS34* má vliv na množství a lokalizaci Flo11p v buňkách kmene BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* ve srovnání s kmenem BR-F Flo11p-GFP.

Intenzitu a lokalizaci fluorescenčního signálu Flo11p-GFP jsem sledoval pomocí fluorescenčního mikroskopu u buněk odebraných z kolonií kultivovaných 3, 4 a 5 dnů na GM. Nepozoroval jsem rozdíl mezi rodičovským kmenem a kmenem BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* (nevyobrazeno). Abych ověřil, že tento fenotyp je nezávislý na kultivačním médiu, pozoroval jsem intenzitu a lokalizaci fluorescenčního signálu Flo11p-GFP v buňkách odebraných 3. a 5. den z kolonií kultivovaných na EM, GM a YD médiích. Rozdíl mezi rodičovským kmenem a kmenem s konstitutivní expresí *VPS34* není patrný na žádném z použitých médií a neliší se mezi 3. a 5. dnem kultivace (Obr. 5.27). Autofluorescence kmene BR-F je při těchto kultivačních podmínkách zanedbatelná. Je však dobře viditelný rozdíl v intenzitě fluorescence Flo11p-GFP na YD ve srovnání s EM nebo GM. Nejsilnější signál je uvnitř vakuol a na povrchu buněk.

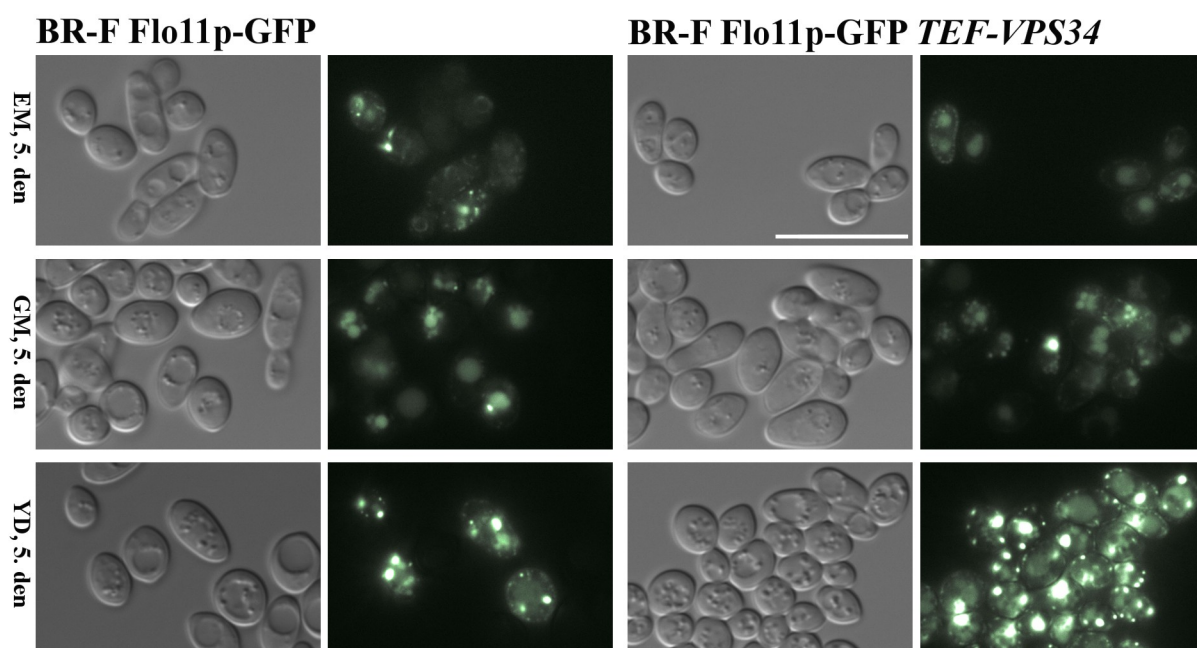
Protože na fotografiích pořízených fluorescenčním mikroskopem nebyly patrné rozdíly v intenzitě fluorescence Flo11p-GFP, použil jsem pro ověření těchto výsledků měření intenzity fluorescence pomocí spektrofotometru. Měřil jsem fluorescenci u 10 kolonií ze tří různých misek od každého kmene při kultivaci na EM, GM a YD. Pro změření a odečet pozadí jsem použil kmen BR-F. Výsledky měření pětidenních kolonií jsou uvedeny v Tab. 5.10.

Tab. 5.10: Srovnání intenzity fluorescence Flo11p-GFP u pětidenních kolonií

Kmen a kultivační podmínky	Průměrná intenzita fluorescence při $\lambda = 513 \text{ nm}$ (cps)	Směrodatná odchylka (cps)
BR-F Flo11p-GFP, EM	2,92E+05	8,26E+04
BR-F Flo11p-GFP <i>TEF-VPS34</i> , EM	3,49E+05	6,54E+04
BR-F Flo11p-GFP, GM	4,01E+05	6,60E+04
BR-F Flo11p-GFP <i>TEF-VPS34</i> , GM	3,78E+05	5,70E+04
BR-F Flo11p-GFP, YD	1,14E+06	1,27E+05
BR-F Flo11p-GFP <i>TEF-VPS34</i> , YD	1,23E+06	6,17E+04

Hladiny statistické významnosti: <0,05 = *, <0,01 = **, <0,001 = *** určené pomocí t-testu. Pro výpočet průměrné intenzity fluorescence jsem použil 10 kolonií ze 3 různých misek od každého kmene.

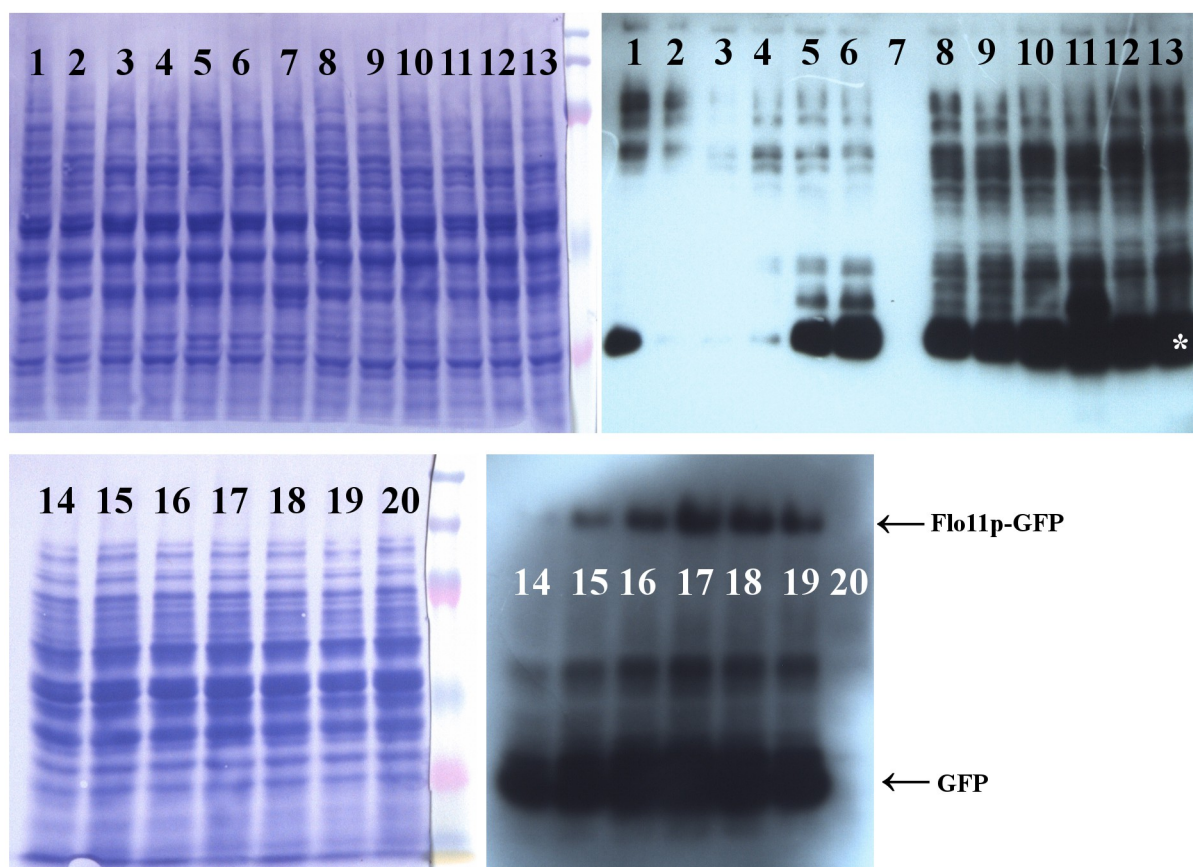
Jak je patrné z Tab. 5.10, mezi kmenem BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* a rodičovským kmenem není signifikantní rozdíl v intenzitě fluorescence kolonií na žádném z testovaných médií. Je však významný rozdíl mezi intenzitou Flo11p-GFP na různých médiích. Nejvyšší intenzita fluorescence, a tedy i největší množství Flo11p-GFP, je v koloniích při kultivaci na YD.



Obr. 5.27: Intenzita a lokalizace fluorescence Flo11p-GFP u kmene BR-F Flo11p-GFP ve srovnání s rodičovským kmenem

Buňky pocházejí z pětidenních monoklonií kultivovaných na EM, GM nebo YD. Doba expozice fluorescence je 5s na EM a 3s na GM a YD.

Rozdíly v produkci Flo11p-GFP mezi kmenem BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* a rodičovským kmenem jsem ověřil také pomocí Western blot analýzy s imunodetekcí pomocí protilátky specifické k GFP (kultivace 3, 5 a 7 dní na EM, GM a YD), Obr. 5.28. Intenzitu signálu Flo11p-GFP i samotného GFP jsem vyhodnocoval v programu ImageJ. I přes snahu o optimalizaci imunodetekce (delší promývání membrán po Western blotu, různá množství nanášených proteinů, zvýšení koncentrace kaseinu, prodloužení blokování membrán, různá koncentrace protilátky a různá doba expozice filmu při imunodetekci) jsem měl problémy s vysokým pozadím a neexponovanými oblastmi filmu. Analyzoval jsem proto pouze vzorky 8-13 (pouze signál samotného GFP, pro analýzy intenzity signálu jsem použil film s kratší expozicí) a 16-19 (signál odpovídají Flo11p-GFP a GFP samotnému). Hodnoty signálu z filmu jsem koreloval na hodnoty signálu z gelu, aby odpovídaly proteinové nanášce.



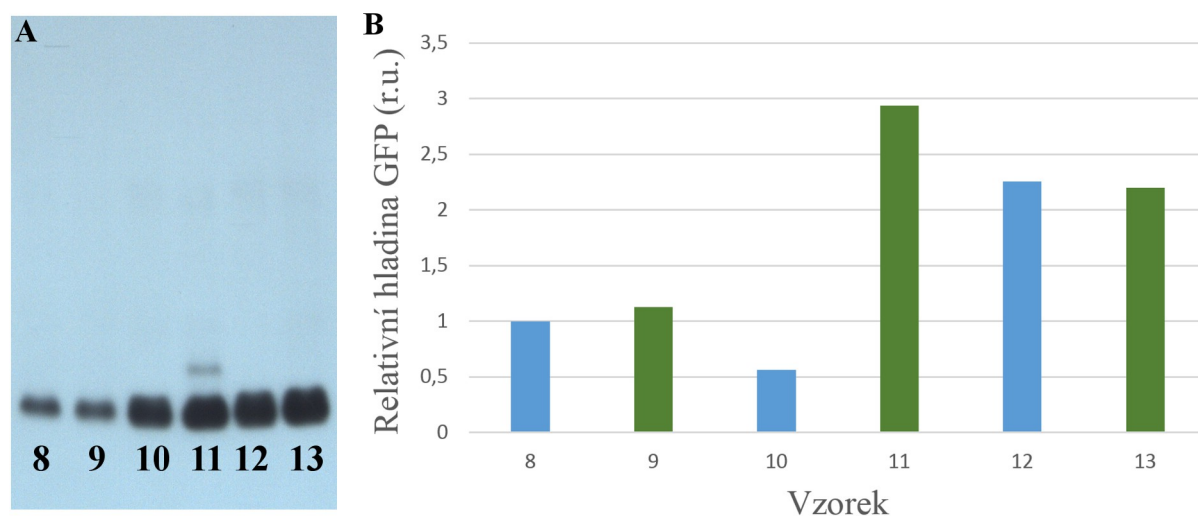
Vzorek	Kmen a kultivace	Vzorek	Kmen a kultivace
1	BR-F Flo11p-GFP, GM, 3. den	11	BR-F Flo11p-GFP <i>TEF-VPS34</i> , EM, 5. den
2	BR-F Flo11p-GFP <i>TEF-VPS34</i> , GM, 3. den	12	BR-F Flo11p-GFP, EM, 7. den
3	BR-F Flo11p-GFP, GM, 5. den	13	BR-F Flo11p-GFP <i>TEF-VPS34</i> , EM, 7. den
4	BR-F Flo11p-GFP <i>TEF-VPS34</i> , GM, 5. den	14	BR-F Flo11p-GFP, YD, 3. den
5	BR-F Flo11p-GFP, GM, 7. den	15	BR-F Flo11p-GFP <i>TEF-VPS34</i> , YD, 3. den
6	BR-F Flo11p-GFP <i>TEF-VPS34</i> , GM, 7. den	16	BR-F Flo11p-GFP, YD, 5. den
7	BR-F, GM, 7. den	17	BR-F Flo11p-GFP <i>TEF-VPS34</i> , YD, 5. den
8	BR-F Flo11p-GFP, EM, 3. den	18	BR-F Flo11p-GFP, YD, 7. den
9	BR-F Flo11p-GFP <i>TEF-VPS34</i> , EM, 3. den	19	BR-F Flo11p-GFP <i>TEF-VPS34</i> , YD, 7. den
10	BR-F Flo11p-GFP, EM, 5. den	20	BR-F, YD, 7. den

Obr. 5.28: Western blot analýza a imunodetekce GFP fúzaného s Flo11p u kmene BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* ve srovnání s rodičovským kmenem

V levé části jsou membrány po Western blotu obarvené Coomassie Brilliant Blue R-250, vpravo jsou výsledky imunodetekce GFP fúzaného na N-konec Flo11p. Flo11p-GFP má molekulovou hmotnost ~163 kDa (vyznačeno šipkou). GFP samotné má molekulovou hmotnost ~26,9 kDa (vyznačeno *, nebo šipkou). Nanášel jsem 6 µg proteinů od každého vzorku.

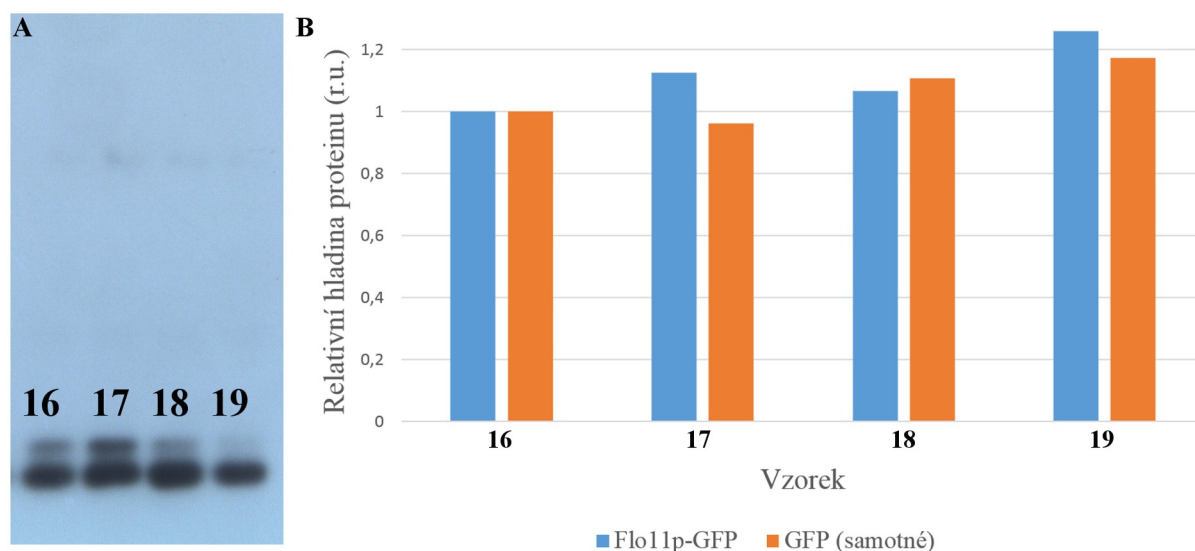
Pátý den kultivace na EM má kmen BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* ~5× vyšší intenzitu signálu samotného GFP než rodičovský kmen (Obr. 5.29). Jiné dny kultivace rozdíl není. U obou kmenů však narůstá intenzita signálu samotného GFP 5. a 7. den kultivace oproti 3. dni ~2×.

Při kultivaci na YD (5. a 7. den) není rozdíl v intenzitě signálu odpovídajícího Flo11p-GFP nebo samotnému GFP mezi rodičovským kmenem a BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* (Obr. 5.30).



Obr. 5.29: Změny relativní hladiny samotného GFP u kmene BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* a rodičovského kmene při kultivaci na EM

A) Western blot analýza hladiny samotného GFP (~26,9 kDa) u kmene BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* a rodičovského kmene při kultivaci na EM. B) Změny relativní hladiny samotného GFP vycházejí z analýzy Obr. 5.28 pomocí programu ImageJ a jsou korelovány na 3. den kultivace BR-F Flo11p-GFP. Intenzita signálu samotného GFP na membráně byla normalizována nanáškou proteinů. Čísla vzorků odpovídají Obr. 5.28. Kmen BR-F Flo11p-GFP je vyznačen modře, kmen BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* je vyznačen zeleně.



Obr. 5.30: Změny relativní hladiny Flo11p-GFP a samotného GFP u kmene BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* a rodičovského kmene při kultivaci na YD

A) Western blot analýza hladiny samotného GFP (~26,9 kDa) u kmene BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* a rodičovského kmene při kultivaci na YD. B) Změny relativní hladiny samotného GFP vycházejí z analýzy Obr. 5.30A, změny hladiny Flo11p-GFP (~163 kDa) z analýzy Obr. 5.28 pomocí programu ImageJ a jsou korelována na 5. den kultivace BR-F Flo11p-GFP. Intenzita signálu na membráně byla normalizována nanáškou proteinů. Čísla vzorků odpovídají Obr. 5.28.

5.4 Analýzy kmenů produkujících Vps34p značený pomocí GFP

Cílem této části diplomové práce bylo analyzovat expresi Vps34p za neselektivních i selektivních podmínek a sledovat jeho lokalizaci v buňce.

5.4.1 Příprava kmenů s konstruktem *VPS34-yEGFP*

Cíl: Připravit kmeny s Vps34p značeným pomocí GFP na C-konci odvozené od přírodních i laboratorních kmenů *S. cerevisiae*.

Kmeny produkující Vps34p-GFP jsem připravoval od přírodních diploidních kmenů BR-F a PORT a od laboratorních haploidních kmenů BY4742 a ΣS^h . Buňky jsem transformoval kazetou s geny *yEGFP* a *kanMX*. Pozitivní klony jsem selektoval na YD+G418 a následně pomocí PCR ověřil správné vložení kazety za *VPS34*. Sekvenací jsem potvrdil, že kódující úseky *VPS34* i *yEGFP* jsou ve stejném čtecím rámci a proteinová sekvence GFP není mutována. Takto jsem připravil kmeny s konstruktem Vps34p-GFP odvozené od všech uvedených rodičovských kmenů.

5.4.2 Morfologická analýza kolonií kmenů s konstruktem Vps34p-GFP

Cíl: Porovnat morfologii a vývoj kolonií připravených kmenů *S. cerevisiae* produkujících Vps34p-GFP s jejich rodičovskými kmeny. Porovnat růstovou rychlost mezi připravenými a rodičovskými kmeny.

Delece *VPS15* i *VPS34* mají u kmene BY4742 významný negativní vliv na vývoj kolonií, zvláště v rané fázi vývoje (nejvýrazněji do 3. dne), viz Obr. 5.7. Delece *VPS15* u kmene ΣS^h ovlivňuje morfologii kolonií jen minimálně, má však negativní vliv na invazivní růst. Kromě toho delece *VPS15* nebo *VPS34* vedou k inhibici růstu kolonií a ke zvýšení citlivosti k některým inhibitorům (Tab. 5.7, Obr. 5.9 a 5.10). Zajímalo mě proto, zda produkce Vps34p, který je na svém C-konci značený pomocí GFP má vliv na morfologii kolonií u haploidních laboratorních kmenů.

Morfologie monokolonií kmene BY4742 Vps34p-GFP je oproti rodičovskému kmeni změněna, okraje kolonií jsou méně strukturované (Obr. 5.31). Morfologie buněk se neliší od

rodičovského kmene. Průměrná plocha kolonie (5. den kultivace na YD) je signifikantně menší (přibližně o 30 %) než u rodičovského kmene (Tab. 5.11). Nelze však vyloučit, že tento rozdíl je ovlivněn hustším výsevem kmene BY4742 Vps34p-GFP oproti rodičovskému kmeni. Při srovnání kmenů BY4742 s delecí *VPS15*, nebo *VPS34* a kmene BY4742 Vps34p-GFP je patrné, že kmen BY4742 Vps34p-GFP je z hlediska morfologie kolonií a plochy kolonií odlišný od delečních kmenů i rodičovského kmene a jeho fenotyp je určitým přechodem mezi těmito kmeny.

Tab. 5.11: Průměrná plocha pětidenních kolonií kmenů BY4742 a BY4742 Vps34p-GFP rostoucích na YD

Kmen	Celkový počet kolonií	Průměrný počet kolonií na misce	Průměrná plocha kolonie (mm ²)	Směrodatná odchylka (mm ²)
BY4742	559	80	7,4	1,0
BY4742 Vps34p-GFP	801	114	5,3*	1,1

Hladiny statistické významnosti: <0,05 = *, <0,01 = **, <0,001 = *** určené pomocí t-testu. Pro výpočet průměrné plochy kolonie jsem použil nejméně 7 misek od každého kmene.

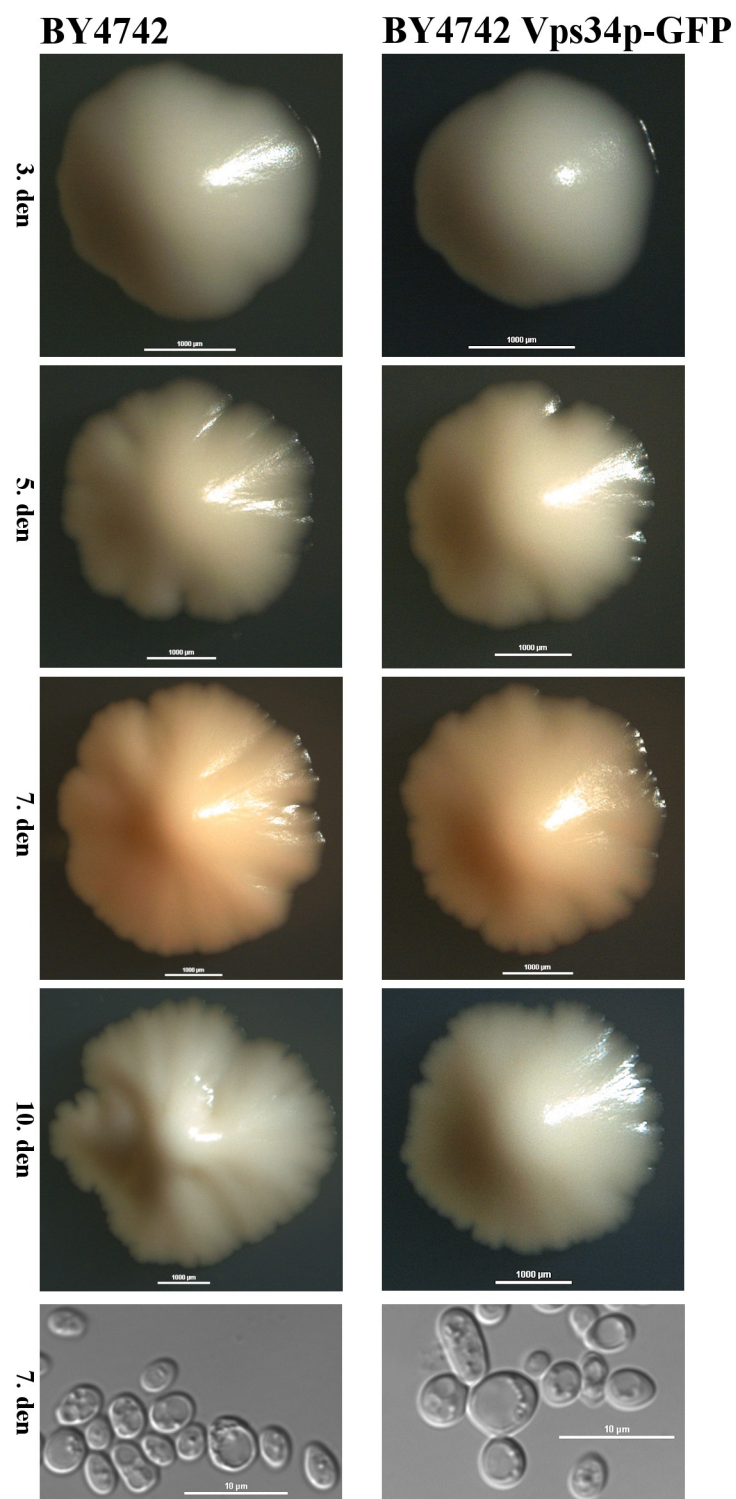
Morfologie monokolonií kmene ΣS^h Vps34p-GFP je při kultivaci na YD oproti rodičovskému kmeni nezměněna, stejně jako morfologie buněk (Obr. 5.32). Schopnost invazivního růstu je však ve srovnání s rodičovským kmenem významně inhibována. Při kultivaci na ethanolovém médiu (EM) vytváří kmen ΣS^h Vps34p-GFP vrásčité kolonie, které jsou výrazně menší než rodičovský kmen (Obr. 5.33). Schopnost zarůstání do agarů je nezměněna. Při kultivaci na GM tvoří kmen ΣS^h Vps34p-GFP téměř hladké kolonie a ve srovnání s rodičovským kmenem je jeho růst významně inhibován. Také schopnost zarůstání do agarů je narušena.

Průměrná plocha kolonií kmene ΣS^h Vps34p-GFP kultivovaných 5 dní na YD, nebo 7 dní na EM či GM je signifikantně menší než u rodičovského kmene (Tab. 5.12).

Tab. 5.12: Průměrná plocha kolonií kmenů ΣS^h a ΣS^h Vps34p-GFP rostoucích na YD, GM a EM

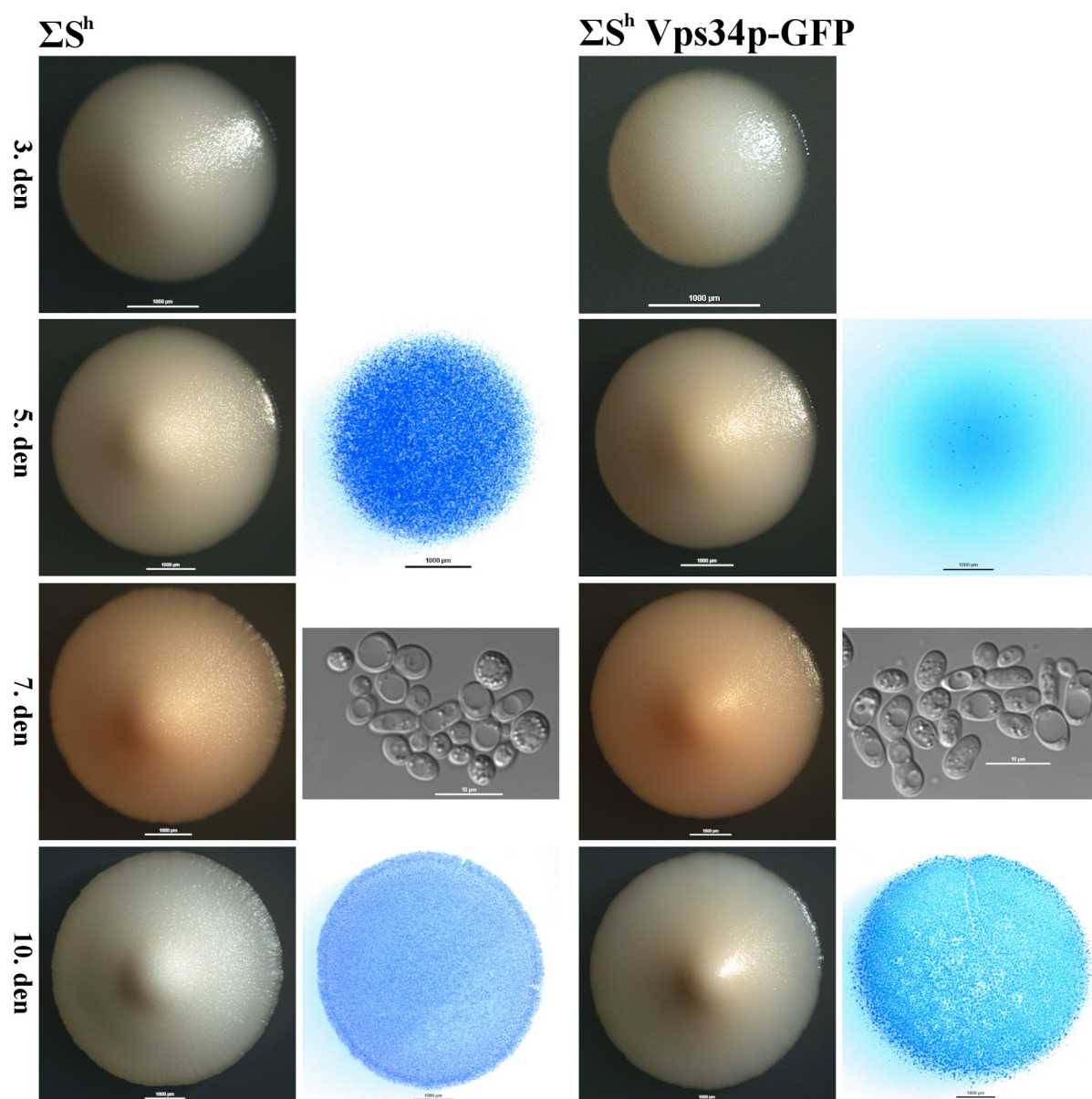
Kmen a kultivační podmínky	Celkový počet kolonií	Průměrný počet kolonií na misce	Průměrná plocha kolonie (mm ²)	Směrodatná odchylka (mm ²)
ΣS^h – 5. den na YD	976	98	11,9	1,1
ΣS^h Vps34p-GFP – 5. den na YD	1056	106	9,7***	1,2
ΣS^h – 7. den na GM	559	93	7,9	0,7
ΣS^h Vps34p-GFP – 7. den na GM	885	98	1,4***	0,2
ΣS^h – 7. den na EM	844	94	8,5	0,8
ΣS^h Vps34p-GFP – 7. den na EM	988	99	2,9***	0,2

Hladiny statistické významnosti: <0,05 = *, <0,01 = **, <0,001 = *** určené pomocí t-testu. Pro výpočet průměrné plochy kolonie jsem použil nejméně 6 misek od každého kmene.



Obr. 5.31: Morfologická analýza kmenů BY4742 Vps34p-GFP v porovnání s rodičovským kmenem

Morfologii kolonií jsem sledoval při kultivaci na YD 3., 5., 7. a 10. den (měřítko 1 mm). Buňky pocházejí ze sedmidenních kolonií kultivovaných na YD (měřítko 10 µm).



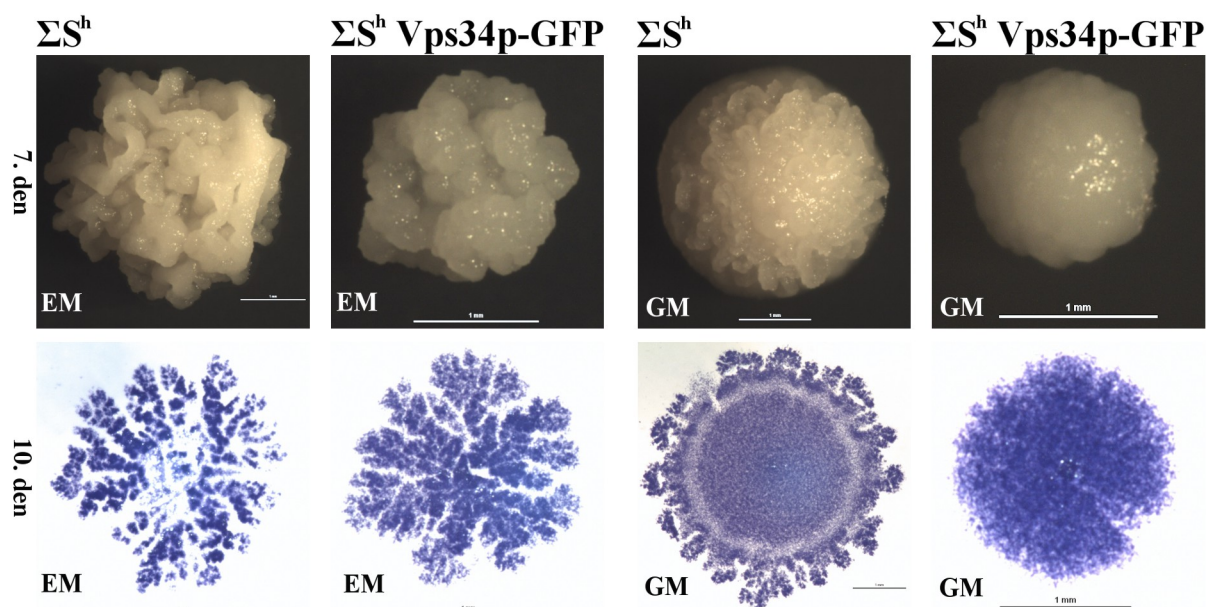
Obr. 5.32: Morfologická analýza kmene ΣS^h Vps34p-GFP v porovnání s rodičovským kmenem

Morfologii kolonií jsem sledoval při kultivaci na YD 3., 5., 7. a 10. den (měřítko 1 mm). Buňky pocházejí ze sedmidenních kolonií kultivovaných na YD (měřítko 10 μm). Modré stopy kolonií ukazují schopnost invazivního růstu daného kmene (5. a 10. den, měřítko 1 mm).

Morfologie kolonií kmenů BR-F Vps34p-GFP a PORT Vps34p-GFP je ve srovnání s rodičovskými kmeny nezměněna (nevyobrazeno).

Abych ověřil, že menší průměrná plocha kolonie u kmene ΣS^h Vps34p-GFP ve srovnání s rodičovským kmenem je dána inhibicí růstu buněk tohoto kmene způsobenou C-koncovým značením Vps34p pomocí GFP a není způsobena inhibicí při vývoji kolonií, kultivoval jsem kmen ΣS^h Vps34p-GFP submerzně v YD. Pro srovnání jsem kultivoval také kmen BY4742 *vps34Δ*. Jako kontrolu jsem použil jejich rodičovské kmeny.

Z výsledků uvedených v Tab. 5.13 je patrné, že růst buněk kmene ΣS^h Vps34p-GFP je ve srovnání s rodičovským kmenem signifikantně inhibován také při submerzní kultivaci, podobně jako kmen BY4742 *vps34Δ*. Růst kmene BY4742 *vps34Δ* je však inhibován více než kmene ΣS^h Vps34p-GFP, což může ukazovat na sníženou, ne však nulovou aktivitu Vps34p u kmene ΣS^h Vps34p-GFP.



Obr. 5.33: Morfologická analýza kmene ΣS^h Vps34p-GFP v porovnání s rodičovským kmenem

Morfologii sedmidenních kolonií na EM a GM (měřítko 1 mm). Modré stopy kolonií ukazují schopnost invazivního růstu daného kmene (10. den, měřítko 1 mm).

Tab. 5.13: Růst buněk měřený pomocí nárůstu OD u submerzních kultur v YD

Kmen	Průměrné OD na 1 ml kultury	Směrodatná odchylka
ΣS^h	1,66	0,02
ΣS^h Vps34p-GFP	1,21**	0,04
BY4742	1,43	0,02
BY4742 <i>vps34Δ</i>	0,70***	0,02

Hladiny statistické významnosti: <0,05 = *, <0,01 = **, <0,001 = *** určené pomocí t-testu. Kultivace 6 hodin v YD při 28 °C na třepačce. Počáteční OD u kmenů odvozených od BY4742 bylo 0,2, u kmenů odvozených ΣS^h bylo počáteční OD 0,3. Tři paralelní vzorky od každého kmene.

5.4.3 Citlivost kmenů produkujících Vps34p-GFP k inhibitorům

Cíl: Sledovat vliv C-koncového značení Vps34p pomocí GFP na fitness kolonie v přítomnosti inhibitoru.

Vliv inhibitorů na růst buněk jsem určoval pomocí kapkových testů, kdy jsem sledoval, jaké množství buněk je schopné růstu. Takto jsem testoval kmeny BY4742 Vps34p-GFP a Σ^h Vps34p-GFP. Výsledky jsou uvedeny v kapitole 5.2.5. Kmeny produkující Vps34p-GFP odvozené od přírodních diploidních kmenů BR-F a PORT jsem netestoval, protože lze očekávat, že případné narušení funkce Vps34p značením jeho C-konce pomocí GFP bude vyváženo produkcí neznačeného Vps34p kódovaného druhou alelou *VPS34*.

5.4.4 Exprese a lokalizace Vps34p-GFP

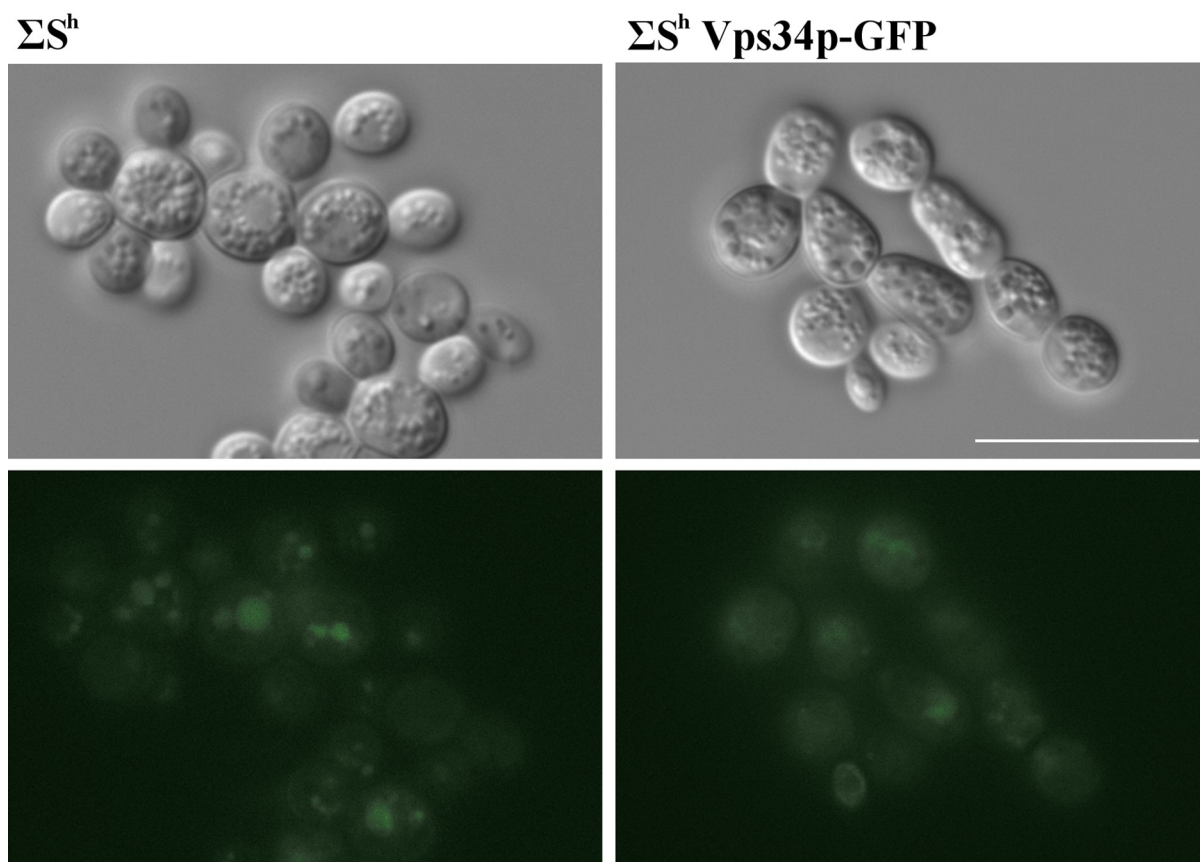
Cíl: Sledovat expresi a lokalizaci Vps34p-GFP za neselektivních i selektivních podmínek.

Intenzitu a lokalizaci fluorescenčního signálu Vps34p-GFP u kmene Σ^h Vps34p-GFP jsem sledoval pomocí fluorescenčního mikroskopu 3., 5. a 7. den u buněk odebraných z kolonií kultivovaných na YD a 5. a 7. den na GM nebo EM. Jak je patrné z Obr. 5.34, u kmene Σ^h je při kultivaci na YD silná autofluorescence, zejména v oblasti vakuol. U kmene Σ^h Vps34p-GFP je fluorescenční signál slabší a více difuzní než u rodičovského kmene. Odlišit signál Vps34p-GFP od autofluorescence pouhým okem je velmi obtížné. Obdobně je tomu při kultivaci na GM či EM, fluorescenční signál je však v těchto případech výrazně slabší než při kultivaci na YD (nevyobrazeno).

Protože rozdíly v intenzitě a lokalizaci fluorescenčního signálu mezi rodičovským kmenem a kmenem Σ^h Vps34p-GFP byly na fotografiích pořízených fluorescenčním mikroskopem téměř nerozlišitelné, použil jsem pro ověření těchto výsledků měření intenzity fluorescence pomocí spektrofotometru. Měřil jsem vždy 10 kolonií ze tří různých misek od každého kmene 5. a 7. den při kultivaci na YD. Médium s jiným zdrojem uhlíku (např. EM nebo GM) bohužel nelze použít, protože kolonie kmene Σ^h Vps34p-GFP rostoucí na těchto médiích jsou pro měření pomocí spektrofotometru příliš malé (viz Tab. 5.12).

Výsledky měření intenzity fluorescence kolonií kmene Σ^h Vps34p-GFP ukazují, že intenzita fluorescence je ve srovnání s rodičovským kmenem signifikantně vyšší (Tab. 5.14).

Čistá intenzita fluorescence kolonií kmene ΣS^h Vps34p-GFP je 7. den o ~50 % vyšší než 5. den kultivace ($4,5E+04$, respektive $3,0E+04$), což naznačuje vyšší expresi Vps34p v těchto koloniích.



Obr. 5.34: Sledování lokalizace proteinu Vps34p-GFP v buňkách kmene ΣS^h Vps34p-GFP

Buňky pocházejí z monoklonií kultivovaných 7 dní na YD. Expozice fluorescence byla 5s.

Tab. 5.14: Srovnání intenzity fluorescence kolonií rodičovského kmene a kmene ΣS^h Vps34p-GFP

Kmen a kultivační podmínky	Průměrná intenzita fluorescence při $\lambda = 513 \text{ nm}$ (cps)	Směrodatná odchylka (cps)
ΣS^h , YD, 5. den	$2,30E+05$	$1,39E+04$
ΣS^h Vps34p-GFP, YD, 5. den	$2,60E+05^{***}$	$1,98E+04$
ΣS^h , YD, 7. den	$2,50E+05$	$1,64E+04$
ΣS^h Vps34p-GFP, YD, 7. den	$2,95E+05^{***}$	$2,29E+04$

Hladiny statistické významnosti: $<0,05 = *$, $<0,01 = **$, $<0,001 = ***$ určené pomocí t-testu. Pro výpočet průměrné intenzity fluorescence jsem použil 10 kolonií ze 3 různých misek od každého kmene.

Intenzitu a lokalizaci fluorescence Vps34p-GFP jsem sledoval pomocí fluorescenčního mikroskopu také u kmene BY4742 Vps34p-GFP (kultivace na pevném médiu – YD, YD+0,01% SDS a YD+0,02mM CdSO_4) a u kmene PORT Vps34p-GFP (submerzní kultivace – 8 nebo 24

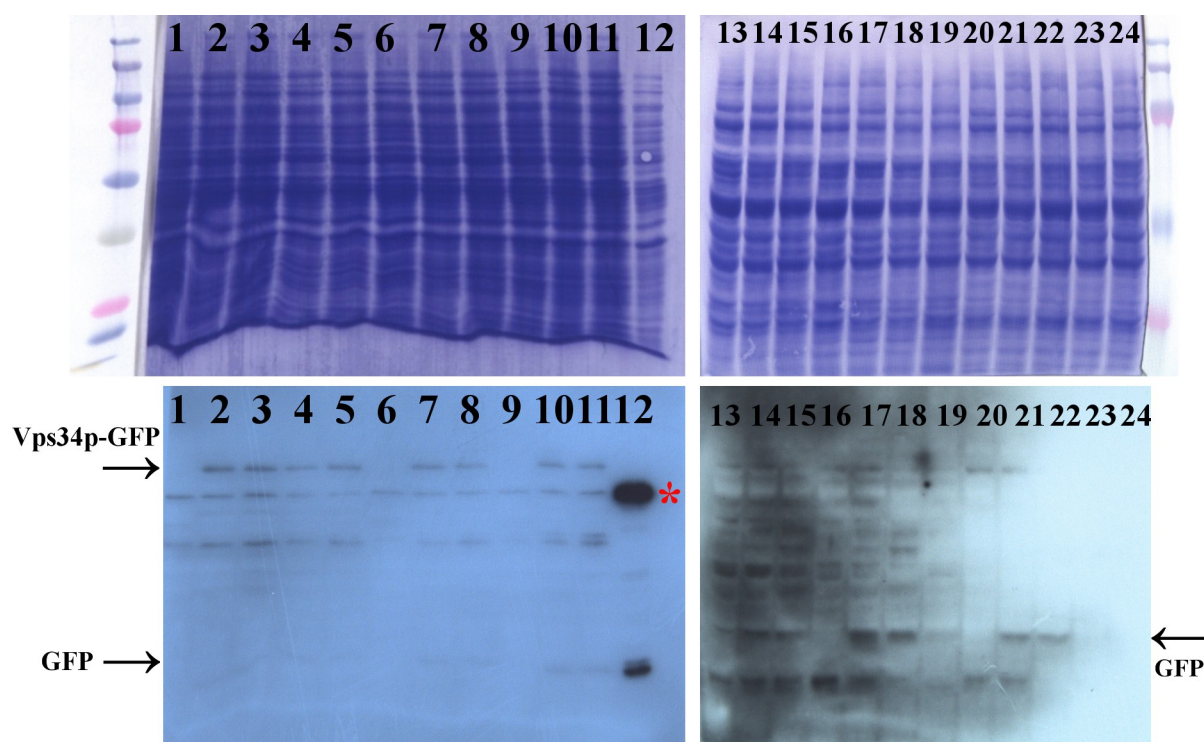
hodin v YD, YD+0,05mM Na₂SeO₄, GM a GM+0,05mM Na₂SeO₄) ve srovnání s rodičovskými kmeny. Podobně jako u Σ^{Sh} Vps34p-GFP jsem testoval více připravených kmenů odvozených od jednoho rodiče. Nepozoroval jsem významný rozdíl mezi fluorescencí kmenů produkujících Vps34p-GFP a autofluorescencí u rodičovských kmenů (nevyobrazeno).

Produkcí Vps34p-GFP u jednotlivých kmenů za různých kultivačních podmínek jsem ověřil také pomocí Western blot analýzy s imunodetekcí pomocí protilátky specifické k GFP, Obr. 5.35. Intenzitu signálu Vps34p-GFP jsem vyhodnocoval v programu ImageJ. I přes snahu o optimalizaci imunodetekce (delší promývání membrán po Western blotu, různá množství nanášených proteinů, zvýšení koncentrace kaseinu, prodloužení blokování membrán, různá koncentrace protilátky a různá doba expozice filmu při imunodetekci) jsem měl problémy s vysokým pozadím a neexponovanými oblastmi filmu. Analyzoval jsem proto pouze vzorky 1-11 (signál odpovídající Vps34p-GFP). Hodnoty signálu z filmu jsem koreloval na hodnoty signálu z gelu, aby odpovídaly proteinové nanášce.

Výsledky analýzy v programu ImageJ ukazují, že hladina Vps34p-GFP je nejvyšší 4. den kultivace na YD (testováno 4., 5., 6. a 7. den kultivace). Ostatní dny je hladina Vps34p-GFP nižší o ~40 %, s prodlužujícím se časem kultivace se však již nemění (Obr. 5.36).

Intenzitu signálu Vps34p-GFP u kmenů kultivovaných na médiích s inhibitory bohužel nešlo určit kvůli problémům s expozicí filmů a vysokému pozadí. Podařilo se mi však alespoň ověřit, že připravené kmeny BY4742 Vps34p-GFP, Σ^{Sh} Vps34p-GFP a PORT Vps34p-GFP produkují GFP. Slabý signál samotného GFP u vzorku 13 je zřejmě způsoben únikem vzorku 14 do jamky vzorku 13, protože při imunodetekci jiných Western blotů s tímto kmenem nebyl signál odpovídající GFP přítomen.

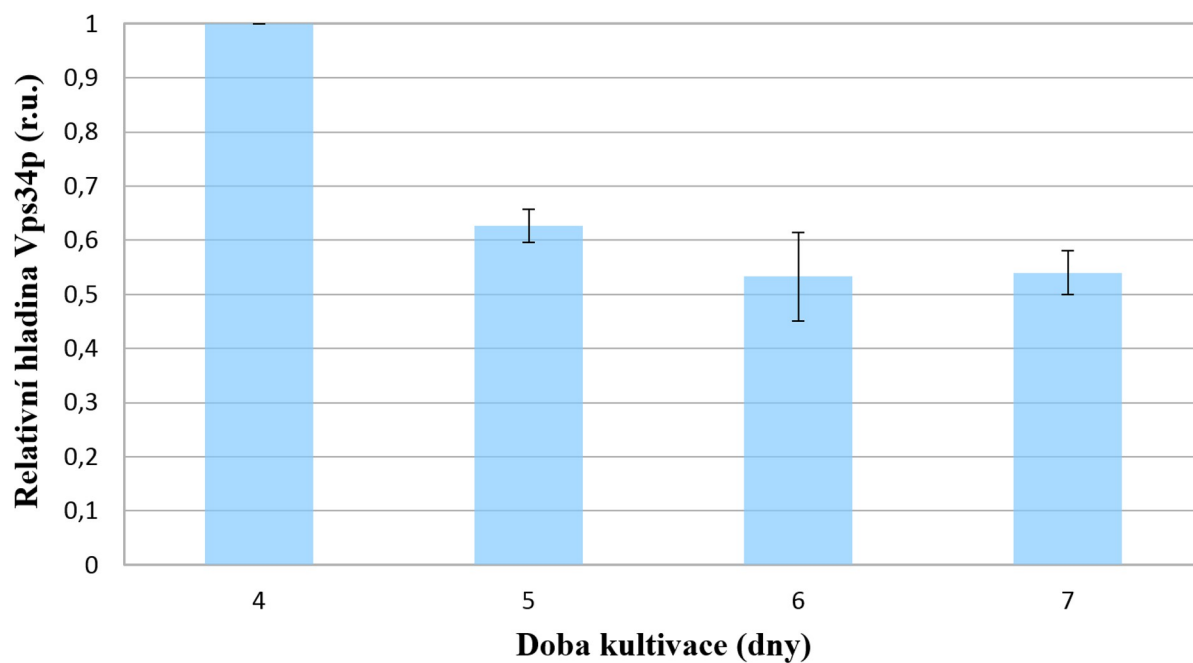
Vysvětlením problémů s detekcí Vps34p-GFP pomocí fluorescenční mikroskopie či spektrofotometru je zřejmě nízká hladina Vps34p v buňkách. Jak je patrné z Obr. 5.35, intenzita signálu Ino1p-GFP je výrazně vyšší než intenzita signálu Vps34p-GFP, přestože proteinová nanáška vzorku s Ino1p-GFP byla více než 4× nižší než u vzorků s Vps34p-GFP.



Vzorek	Kmen a kultivace	Vzorek	Kmen a kultivace
1	ΣS^h , YD, 4. den	13	BY4742, YD, 7. den
2	ΣS^h Vps34p-GFP, YD, 4. den	14	BY4742 Vps34p-GFP, YD, 7. den
3	ΣS^h Vps34p-GFP, YD, 4. den	15	BY4742 Vps34p-GFP, YD+0,01% SDS, 7. den
4	ΣS^h Vps34p-GFP, YD, 5. den	16	ΣS^h , YD, 7. den
5	ΣS^h Vps34p-GFP, YD, 5. den	17	ΣS^h Vps34p-GFP, YD, 7. den
6	ΣS^h , YD, 6. den	18	ΣS^h Vps34p-GFP, YD+0,01% SDS, 7. den
7	ΣS^h Vps34p-GFP, YD, 6. den	19	ΣS^h Vps34p-GFP, YD+CuSO ₄ , 7. den
8	ΣS^h Vps34p-GFP, YD, 6. den	20	PORT, GM, 3. den
9	ΣS^h , YD, 7. den	21	PORT Vps34p-GFP, GM, 3. den
10	ΣS^h Vps34p-GFP, YD, 7. den	22	PORT Vps34p-GFP, GM+0,05mM Se, 3. den
11	ΣS^h Vps34p-GFP, YD, 7. den	23	PORT Vps34p-GFP, GM, 3. den
12	PORT Ino1p-GFP, GM, 5. den	24	PORT Vps34p-GFP, GM+0,05mM Se, 3. den

Obr. 5.35: Western blot analýza a imunodetekce GFP fúzaného s Vps34p

V horní části jsou membrány po Western blotu obarvené Coomassie Brilliant Blue R-250, dole jsou výsledky imunodetekce GFP fúzaného na C-konec Vps34p. Vps34p-GFP má molekulovou hmotnost ~128 kDa, GFP samotné má molekulovou hmotnost ~26,9 kDa. Od vzorků 1-11 jsem nanášel 26 μ g proteinů, od vzorku 12 – 6 μ g proteinů a od vzorků 13-24 – 12 μ g proteinů. Ino1p-GFP (~86,5 kDa) je vyznačen červenou hvězdičkou. Testoval jsem 2 různé kmeny ΣS^h Vps34p-GFP.



Obr. 5.36: Změny relativní hladiny Vps34p u kmene ΣS^h Vps34p-GFP v průběhu kultivace monoklonií na YD korelované na 4. den kultivace

Uvedená data vycházejí z analýzy Obr. 5.35 pomocí programu ImageJ a jsou průměrem hodnot obou testovaných kmenů ΣS^h Vps34p-GFP. Intenzita signálu na membráně byla normalizována nanáškou proteinů.

5.5 Diskuze experimentální části práce

Cílem experimentální části práce bylo určit vliv PI3K signální dráhy, tvořené Vps15p a Vps34p na růst a vývoj kvasinkových kolonií u divokých i laboratorních kmenů *Saccharomyces cerevisiae*. Transformací s využitím homologní rekombinace jsem připravil kmeny s delecí *VPS15* nebo *VPS34*, kmeny se zvýšenou expresí *VPS34* a kmeny produkující Vps34p značený na C-konci pomocí GFP. U připravených kmenů jsem sledoval velikost a morfologii kolonií a buněk, schopnost filamentárního růstu a pomocí kapkových testů také odolnost kmenů k vybraným inhibitorům. U kmenů produkujících Vps34p-GFP jsem sledoval jeho lokalizaci a produkci za neselektivních i selektivních podmínek pomocí fluorescenční mikroskopie, spektrofluorometru a Western blot analýzy s imunodetekcí.

5.5.1 Příprava kmenů s delecí *VPS34* nebo *VPS15*

Kmeny s delecí *VPS34* jsem připravoval od přírodních diploidních a laboratorních haploidních kmenů. Při použití glycerolu jako zdroje uhlíku v selekčních médiích jsem získal kmeny s odstraněnými dvěma či třemi alelami (přírodní diploidní kmeny) či s odstraněnou jednou alelou (laboratorní haploidní kmeny), které však stále nesly další alelu *VPS34*. Úspěšnost získání pozitivních klonů významně klesala s odstraněním každé další nadbytečné alely. Protože delece *VPS34* vede k absenci respiračního růstu (*Yoshida a Anraku, 2000*), lze předpokládat, že za těchto nepříznivých podmínek jsem vyseletoval kmeny, u kterých došlo ke chromozomovým či genomovým přestavbám. Gen *VPS34* leží na dlouhém raménku chromozomu XII (*Cherry et al., 2012*). Tento chromozom je nejméně stabilní z celého genomu, protože obsahuje oblasti rDNA (*Lewinska et al., 2014*), což může být vysvětlením pozorovaných výsledků. Samozřejmě nelze vyloučit, že došlo k aneuploidii celého chromozomu. Tan a kolektiv popsali, že změny morfologie kolonií některých haploidních kmenů jsou způsobeny dizomií chromozomu III, VII nebo IX. Dizomie chromozomu XII je však stabilní pouze v případě, že současně došlo k dizomii chromozomu XV (*Tan et al., 2013*). Další možností je vznik stabilní směsné kultury obsahující nejméně dva typy buněk, které nesou rezistenci k jednomu nebo druhému antibiotiku.

Při přípravě kmenů s delecí *VPS34* se selekcí na YD+antibiotikum jsem nezískal žádný kmen odvozený od laboratorních kmenů a všechny připravené kmeny odvozené od přírodních kmenů měly obě deleční kazety integrované v jednom lokusu. Přestože jsem použil různé deleční primery pro přípravu obou kazet, došlo k rekombinaci mezi kazetami – zřejmě přes oblasti *lox* rozpoznávané rekombinázou Cre, které jsou přítomny u obou kazet. Proč nedošlo k odstranění obou alel a k „vytvoření“ třetí alely jako při selekci na GM+antibiotikum, není jasné, lze jen

předpokládat, že je zde souvislost s metabolismem, protože tento fenotyp jsem pozoroval jen při respiračním růstu.

VPS34 je esenciální gen u kmene $\Sigma 1278b$, ne však u kmene S288c – esencialita genu je podmíněna celkovým genetickým pozadím daného kmene (Dowell *et al.*, 2010). Kmen $\Sigma 1278b$ byl připraven nezávisle ve dvou různých laboratořích ze stejného rodičovského kmene. Kmeny $\Sigma 1278b$ z obou laboratoří se chovají mírně odlišně (Reynolds, T., osobní sdělení). Tomu odpovídá výsledek práce Sarode a kolektivu, kteří připravili kmen $\Sigma 1278b vps34\Delta$ (Sarode *et al.*, 2011).

Na základě výsledků přípravy delečních kmenů od přírodních kmenů (více než 2 alely u diploidních kmenů, rekombinace delečních kazet mezi sebou) usuzuji, že pro přírodní kmeny je *VPS34* esenciálním genem. Stejně tak je tomu zřejmě u kmene ΣS^h , který je odvozený od kmene $\Sigma 1278b$. Proč se nepodařila příprava kmene BY4742 *vps34\Delta*, když tento kmen připravit lze (viz BY BY4742 *vps34\Delta* ze sbírky EUROSCARF), není jasné. Problematické přípravě tohoto delečního kmene nasvědčuje také to, že ani kmen BY4742 *vps34\Delta* ze sbírky EUROSCARF nebyl přečištěným kmenem, ale směsí buněk s *VPS34* nebo bez něj.

Pro ověření těchto výsledků by bylo vhodné pracovat po transformaci s jednotlivými buňkami (například vytříděním jednotlivých buněk pomocí průtokové cytometrie), aby výsledky nebyly ovlivněny shluky transformovaných a netransformovaných buněk, které vytvoří heterogenní buněčnou populaci.

Příprava kmenů s delecí *VPS15* odvozených od laboratorních kmenů byla ve srovnání s přípravou kmenů s delecí *VPS34* bez komplikací, což potvrzuje, že *VPS15* není esenciální gen. Je však třeba provádět selekci transformantů na YD+antibiotikum, protože delece *VPS15* vede k absenci respiračního růstu (Merz a Westermann, 2009).

5.5.2 Morfologie a růst kolonií kmenů s delecí *VPS15* nebo *VPS34*

Kmeny BY4742 *vps15\Delta* a BY4742 *vps34\Delta* vytvářejí při kultivaci na YD hladké kolonie (rodičovský kmen vytváří kolonie s mírně strukturovanými okraji) a průměrná plocha těchto kolonií je ve srovnání s rodičovským kmenem signifikantně menší. Růstová rychlost kmene BY4742 *vps34\Delta* je při submerzní kultivaci v YD (6 hodin, 28 °C) snížena o ~50 %.

Kmen $\Sigma S^h vps15\Delta$ vytváří při kultivaci na YD kolonie s podobnou morfologií jako rodičovský kmen, v pozdější fázi vývoje má však na svém povrchu papily. Průměrná plocha těchto kolonií je ve srovnání s rodičovským kmenem signifikantně menší. Buňky jsou spíše protáhlé, častěji než u rodičovského kmene. Schopnost invazivního růstu je významně inhibována.

Vysvětlením snížené růstové rychlosti a tvorby menších kolonií je petite fenotype (absence respiračního růstu) spojený s delecí *VPS15* či *VPS34* (Yoshida a Anraku, 2000; Merz a Westermann, 2009). Vps34p je u *S. cerevisiae* nezbytný pro správnou segregaci vakuol mezi mateřskou a dceřinou buňkou (Herman a Emr, 1990) a spolu s Vps15p se podílí na regulaci délky telomer (Rog et al., 2005). Je pravděpodobné, že narušení těchto procesů při delecí hraje rovněž roli v inhibici růstu těchto delečních kmenů.

Buňky s delecí *VPS15* nebo *VPS34* nejsou schopné tvořit strukturované kolonie (biofilm) a delece *VPS34* (avšak ne *VPS15*) vede ke ztrátě schopnosti invazivního růstu kmene $\Sigma 1278b$ při kultivaci na YEPD médiu (Sarode et al., 2011; Adhikari a Cullen, 2015). Mé výsledky ukazují, že delece *VPS15* u kmene ΣS^h vede k výrazné inhibici invazivního růstu. Nelze však vyloučit, že tento fenotyp je spojen s nižší růstovou rychlostí tohoto kmene.

5.5.3 Inhibitorové testy kmenů s delecí *VPS15* nebo *VPS34*

Pro testování vlivu inhibitorů na kmeny BY4742 *vps15 Δ* , BY4742 *vps34 Δ* a ΣS^h *vps15 Δ* pomocí kapkových testů jsem zvolil inhibitory, jejichž vliv na buňky s delecí *VPS15* nebo *VPS34* nebyl dosud zkoumán (podle SGD, Cherry et al., 2012).

Delece *VPS15* nebo *VPS34* vede k neživotaschopnosti buněk při 37 °C a k absenci respiračního růstu (Robinson et al., 1988; Yoshida a Anraku, 2000; Merz a Westermann, 2009).

Selenan sodný (v koncentraci 0,05mM) při kultivaci na glycerolovém médiu indukuje tvorbu strukturovaných kolonií u přírodního kmene PORT, který jinak na glycerolovém médiu vytváří spíše hladké kolonie. Na základě analýzy genové exprese pomocí DNA čipu (angl. DNA microarray) se zdá, že 0,05mM selenan neovlivňuje expresi *VPS34* (RNDr. Michaela Schierová, Ph.D., nepublikované výsledky). Mechanismus působení selenanu na kvasinku není znám. Jiná sloučenina selenu, selenit sodný, vyvolává u kvasinky poškození DNA produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS, z angl. *Reactive Oxygen Species*) (Mániková et al., 2012).

Kationty kadmia a mědi způsobují v buňkách oxidativní stres a poškození proteinů (Clemens et al., 1999). Detergent SDS narušuje cytoplazmatickou membránu a uvolněním iontů z buněk způsobuje osmotický stres (Pringle a Rose, 1979).

Kmen ΣS^h *vps15 Δ* je schopen růstu na GM, přestože jeho růstová schopnost je ve srovnání s rodičovským kmenem snížena $10^4\times$. Je však zcela neschopný růstu při 37 °C. Oproti tomu kmeny BY4742 *vps15 Δ* , BY4742 *vps34 Δ* jsou schopné růstu při 37 °C (růstová schopnost je však ve srovnání s rodičovským kmenem snížena $10^5\times$), ale zcela neschopné růstu na GM. To nasvědčuje rozdílu v metabolismu u těchto kmenů. Deleční kmeny připravené od obou

rodičovských kmenů jsou však shodně zcela neschopné růstu na YD+0,02 mM CdSO₄ a YD+0,01% SDS a jejich růst je inhibován při kultivaci na YD+4mM CuSO₄, což svědčí o citlivosti těchto kmenů k oxidativnímu a hyperosmotickému stresu.

Gen *VPS34* je jedním z přibližně 900 genů u *Saccharomyces cerevisiae*, jejichž exprese je regulována během stresových podmínek, a patří tedy do skupiny genů zapojených do ESR (z angl. *Environmental Stress Response*). Exprese těchto genů je za stresových podmínek regulována (pozitivně nebo negativně) velmi podobně, bez ohledu na typ stresu – osmotický či oxidační stres, nedostatek zdrojů dusíku nebo aminokyselin, teplotní šok či přechod do stacionární fáze (Gasch et al., 2000). U kvasinek *S. cerevisiae*, *Candida albicans* a *Schizosaccharomyces pombe* vede delece *VPS34* ke zvýšení citlivosti vůči iontům kovů a fungicidům (Kimura et al., 1995; Kitanovic et al., 2005; Banuelos et al., 2010). Výsledky kapkových testů jsou ve shodě s publikovanými daty, která ukazují, že delece *VPS15* nebo *VPS34* vede ke snížení citlivosti k iontům kovů a k hyperosmotickému stresu (Banta et al., 1988; Sambade et al., 2005). Zvýšená citlivost k detergentům (SDS) u delečních kmenů může být rovněž způsobena narušením autofágie či jiných mechanismů spojených s odstraňováním poškozených membrán, nebo narušením tvorby biofilmu a s tím spojenou sníženou ochranou před vstupem SDS do buněk.

5.5.4 Testování vlivu KU-55933 na kvasinku *S. cerevisiae*

Inhibitor KU-55933 byl popsán jako ATP kompetitivní inhibitor proteinkinázy ATM (člen rodiny PI3K příbuzných kináz), která hraje roli v udržování integrity genomu (Hickson et al., 2004). Později bylo prokázáno, že KU-55933 je také inhibitorem Vps34, který je selektivní pro PI3K třídy III. Autofágie je inhibována při 2μM koncentraci KU-55933 a PI3K aktivita Vps34 je téměř zcela inhibována při 10μM koncentraci KU-55933 (Farkas et al., 2011). Dosud nebylo popsáno použití KU-55933 u jednobuněčných organismů (podle databáze Web of Science, k datu 11. 8. 2015).

Odolnost k inhibitoru KU-55933 jsem testoval u kmenů BY4742, ΣS^h, BR-F a PORT pomocí kapkového testu. Nepozoroval jsem žádnou změnu schopnosti růstu při použití 10μM nebo 30μM KU-55933 nebo na médiích s patřičným množstvím DMSO (KU-55933 jsem před použitím rozpustil v DMSO).

Pozoroval jsem však, že 0,02% DMSO indukuje u kmenů ΣS^h a BR-F tvorbu vrásčitých makrokolonií. Tento fenotyp je však potlačen v přítomnosti 10μM KU-55933.

Při submerzní kultivaci kmene BY4742 v YD+50μM KU-55933 je růstová rychlost

snížena o ~20 % ve srovnání s kultivací v YD+0,1% DMSO. Tento rozdíl však není statisticky signifikantní.

V koncentraci 5-20% narušuje DMSO membránovou integritu (*Murata et al., 2003*). Fenotyp indukovaný 0,02% DMSO je podobný fenotypu vyvolanému selenanem sodným (v koncentraci 0,05mM) při kultivaci na glycerolovém médiu. Je pravděpodobné, že v obou případech je změna morfologie spojena s buněčnou odpovědí na nepříznivé podmínky prostředí. Protože Vps34p je nezbytný pro tvorbu strukturovaných kolonií (*Sarode et al., 2011*), snížení jeho aktivity v přítomnosti 10μM KU-55933 je možným vysvětlením potlačení změny morfologie indukované 0,02% DMSO.

Absence vlivu KU-55933 na schopnost růstu při kapkových testech a submerzní kultivaci má několik možných vysvětlení:

1) Inhibitor KU-55933 mohl být degradován během přepravy, případně při přípravě pevných médií nebo v průběhu kultivace. Při testování KU-55933 na savcích buňkách se používají kratší doby inkubace, například 12 hodin (*Farkas et al., 2011*). Protože submerzní kultivace trvala jen 6 hodin, je nepravděpodobné, že by k degradaci KU-55933 došlo v průběhu tohoto experimentu.

2) Kvasinkový Vps34p může být odolnější k inhibitoru než savčí Vps34 díky rozdílné sekvenci a s tím spojenými rozdíly v terciární struktuře. Přestože klíčové aminokyselinové zbytky v rámci kinázové domény zodpovědné za vazbu ATP jsou evolučně konzervovány u všech eukaryot (viz Obr. 3.4), nelze tuto možnost vyloučit.

3) Poslední možností je, že inhibitor KU-55933 nevstupuje do kvasinkových buněk nebo je rychle exportován ven, případně degradován.

Nejpravděpodobnější se zdá poslední možnost, případně v kombinaci s druhou možností. Testy prokázaly, že kvasinkové buňky i samotný Vps34p jsou významně odolnější vůči používaným inhibitorům PI3K – wortmanninu a LY294002 ($10^3\times$, respektive $20\times$ oproti savčímu Vps34) (*Stack a Emr, 1994*). Otázkou však je, nakolik jsou tyto inhibitory specifické pro Vps34p ve srovnání s ostatními třídami PI3K.

Pro přesné stanovení vlivu KU-55933 na aktivitu Vps34p by bylo vhodné protein vyizolovat a měřit jeho PI3K aktivitu v přítomnosti KU-55933 *in vitro*. Vzhledem k velmi nízké koncentraci proteinu v buňce by izolace vyžadovala výrazně zvýšenou expresi *VPS34*. Není jisté, že stabilní exprese *VPS34* by neměla negativní vliv na fitness buněk, protože přípravou kmenů se zvýšenou expresí *VPS34* se zabývalo jen několik málo studií (všechny provedené jedinou laboratoří), které nebyly zaměřené na sledování růstových a metabolických změn u těchto kmenů (*Herman a Emr, 1990; Stack et al., 1993; Stack a Emr, 1994; Stack et al., 1995*). Dalším

problémem je, že uměle exprimovaný Vps34p nemusí mít stejnou PI3K aktivitu jako endogenní Vps34p. Rekombinantní savčí Vps34 exprimovaný v savčích buňkách má pouze 5 % PI3K aktivity ve srovnání s endogenním Vps34, zřejmě v důsledku absence regulace Vps15 (Backer, 2008).

5.5.5 Příprava kmenů se zvýšenou expresí *VPS34*

Kmeny s konstruktem *TEF-VPS34* pro konstitutivní expresi *VPS34* jsem připravil od přírodních rodičovských kmenů BR-F, BR-F Flo11p-GFP, BR-S a PORT a od laboratorních kmenů BY4742 a ΣS^h . Nepodařilo se mi osekvenovat takto připravené kmeny, i přes snahu o optimalizaci přípravy templátové DNA i samotné sekvenační reakce (různé sady primerů, Nested PCR, různé koncentrace templátové DNA, různá teplota nasedání primerů, přečištění templátové DNA pro sekvenaci přesrážením ethanolem a solemi či izolace PCR fragmentu z elektroforetického gelu pomocí kitu).

Zvýšení exprese *VPS34* u kmenů s konstruktem *TEF-VPS34* jsem proto ověřil pomocí Northern blot analýzy s následnou hybridizací pomocí radioaktivně značené sondy. Kultury pro izolaci celkové RNA jsem kultivoval 18 hodin v YD při 28 °C a izoloval směsí fenol:chloroform:isoamylalkohol nebo horkým fenolem. Vzorky RNA izolované směsí fenol:chloroform:isoamylalkohol byly více degradované a obsahovaly více kontaminace DNA než vzorky izolované horkým fenolem. To je zřejmě způsobeno větším počtem purifikačních kroků (promývání směsí fenol-chloroformu) při izolaci horkým fenolem. Proto jsem použil pouze data získaná analýzou RNA izolovaných horkým fenolem.

Úroveň exprese *VPS15* (kóduje proteinkinázu regulující Vps34p), *VPS34* (kóduje fosfatidylinositol-3-kinázu), *OPI3* (kóduje methyltransferázu fosfolipidů) a *RPL3* (kóduje protein L3 velké ribozomální podjednotky) jsem kromě kmenů s konstruktem *TEF-VPS34* sledoval také u kmenů BY4742 *vps15Δ*, BY4742 *vps34Δ*, ΣS^h *vps15Δ*, ΣS^h Vps34p-GFP a u rodičovských kmenů. Kmeny s delecí či C-koncovým značením Vps34p pomocí GFP se od rodičovských kmenů a kmenů s konstruktem *TEF-VPS34* významně liší svojí růstovou rychlostí (měřeno pomocí OD a hmotností mokré biomasy po 18 hodinách submerzní kultivace v YD). Deleční kmeny jsou vlivem svého pomalejšího růstu v době odběru v jiné růstové fázi než kmeny s konstruktem *TEF-VPS34* a rodičovské kmeny (viz kapitola 5.5.2).

Abych mohl porovnávat expresi *VPS34* a *VPS15* mezi rodičovskými kmeny a kmeny s konstruktem *TEF-VPS34*, ověřil jsem, že oba kmeny jsou ve stejné růstové fázi pomocí úrovně exprese *OPI3* a *RPL3*. Výsledky naší laboratoře ukazují, že *RPL3* je exprimován hlavně

v exponenciální fázi růstu, zatímco *OPI3* spíše ve stacionární fázi růstu (nepublikováno). Expres *RPL3* a *OPI3* je u rodičovských kmenů a kmenů s konstruktem *TEF-VPS34* srovnatelná. Výjimkou jsou kmeny BY4742 *TEF-VPS34* a Σ^h *TEF-VPS34*, které mají ve srovnání s rodičovským kmenem zvýšenou, respektive sníženou expres *RPL3*. Jejich expres *OPI3* je však srovnatelná s rodičovským kmenem. Je tedy možné, že zvýšená expres *VPS34* ovlivňuje pozitivně, respektive negativně expres *RPL3* u těchto kmenů. Kmeny s delecí *VPS15* nebo *VPS34* či Vps34p značeným pomocí GFP mají ve srovnání s rodičovskými kmeny výrazně zvýšenou expres *RPL3* (~3-5×) a naopak významně sníženou expres *OPI3* (~2-4×), což svědčí o ranější fázi růstu těchto kmenů.

Expres *VPS34* u kmenů s konstruktem *TEF-VPS34* je ve srovnání s rodičovskými kmeny významně zvýšena (~2-6×). Výjimkou je kmen Σ^h *TEF-VPS34*, který má expres *VPS34* zvýšenou oproti rodičovskému kmeni pouze o ~40%. Expres *VPS15* je srovnatelná s rodičovskými kmeny, pouze kmen *PORT TEF-VPS34* má expres *VPS15* zvýšenou (>2×). Vps15p je nezbytný pro plnou aktivaci PI3K aktivity Vps34p (*Stack et al., 1993*). Je možné, že u tohoto kmene je zvýšená expres *VPS34* kompenzována zvýšenou expresí *VPS15*, aby mohl být Vps34p správně regulován.

Kmeny Σ^h Vps34p-GFP, Σ^h *vps15Δ* a BY4742 *vps15Δ* mají expres *VPS34* při porovnání s rodičovskými kmeny významně sníženou (~2-3×). Úroveň exprese *VPS15* je u kmene Σ^h Vps34p-GFP srovnatelná s expresí *VPS34*.

Expres *VPS15* a *VPS34* je výrazně slabší než expres *OPI3* a *RPL3*. Pro detekovatelný signál musela být expozice filmu při detekci *OPI3* a *RPL3* dva dny, zatímco v případě *VPS34* to bylo pět dní a u *VPS15* sedm dní.

Tento experiment by bylo vhodné zopakovat, aby bylo možné ověřit, že získaná data jsou statisticky relevantní a vyzkoušet také jiné kultivační podmínky (pevné médium, různé zdroje uhlíku, inhibitory).

Zvýšená expres *VPS34* samozřejmě nemusí znamenat také zvýšenou hladinu Vps34p. Ověření hladiny Vps34p u kmenů se zvýšenou expresí *VPS34* by bylo vhodné provést například pomocí Western blotu s imunodetekcí pomocí protilátky specifické pro Vps34p, případně pomocí hmotnostní spektrometrie v režimu monitorování vybraných reakcí (SRM, z angl. *selected reaction monitoring*).

5.5.6 Vliv zvýšené exprese *VPS34* na morfologii a růst kolonií

Zvýšená expres *VPS34* nemá ve srovnání s delecí *VPS15* nebo *VPS34* signifikantní vliv

na morfologii, invazivní růst ani na průměrnou plochu kolonií u kmenů odvozených od kmene BY4742. U kmene BR-S *TEF-VPS34* není rozdíl v morfologii kolonií ve srovnání s rodičovským kmenem (hladké kolonie podobně jako kmen BY4742). Kmen PORT *TEF-VPS34* má oproti rodičovskému kmeni zvýšenou schopnost zarůstání do agaru (na YD i GM). Morfologie kolonií jsou u obou kmenů shodné. U kmene BR-F *TEF-VPS34* je morfologie monokolonií při kultivaci na YD i GM ve srovnání s rodičovským kmenem změněna. Podobně je tomu u makrokolonií kmene BR-F *TEF-VPS34* na GM, u kterých je oproti rodičovskému kmeni rovněž významně zvýšena schopnost zarůstání do agaru.

Kmen Σ^h *TEF-VPS34* jsem podrobněji neanalyzoval, protože zvýšení exprese *VPS34* oproti rodičovskému kmeni nebylo výrazné tolik jako u kmenů s konstruktem *TEF-VPS34*, odvozených od jiných rodičovských kmenů. Při kultivaci na GM jsem však nepozoroval rozdíl v morfologii kolonií u kmene Σ^h *TEF-VPS34* ve srovnání s rodičovským kmenem.

Schopnost tvořit strukturované kolonie nebo zarůstat do agaru se zdá být pozitivně ovlivněna zvýšenou expresí *VPS34* u kmenů, které tyto schopnosti přirozeně mají (BR-F a PORT). Tyto výsledky jsou v souladu s informacemi, že Vps34p je nezbytný pro filamentární růst a pro tvorbu strukturovaných kolonií (Sarode et al., 2011; Adhikari a Cullen, 2015). Absence negativního vlivu zvýšené exprese *VPS34* na velikost kolonií v porovnání s rodičovským kmenem naznačuje, že zvýšená exprese *VPS34* nemá na rozdíl od delece *VPS34* negativní vliv na fitness daného kmene.

Vps15p je nezbytný pro plnou aktivaci PI3K aktivity Vps34p. Přestože koncentrace Vps34p v buňce je více než 3× vyšší než koncentrace Vps15p, na membránách endozomů a vakuol je jejich poměr 1:1. K výrazné změně tohoto poměru nedojde ani při zvýšené expresi Vps34p, což svědčí o tom, že Vps15p je na membránách hlavním interakčním partnerem Vps34p (Stack et al., 1993). Je tedy možné, že absence výrazného fenotypu je u kmenů se zvýšenou expresí *VPS34* způsobena nikoliv nízkou hladinou Vps34p, ale nedostatkem jeho pozitivního regulátoru Vps15p.

5.5.7 Inhibitorové testy kmenů se zvýšenou expresí *VPS34*

Při použití kapkových testů jsem nezaznamenal rozdíl ve schopnosti růstu mezi kmeny s konstruktem *TEF-VPS34* a rodičovskými kmeny. Kmen PORT *TEF-VPS34* má mírně inhibovaný růst při kultivaci na YD+10mM Na₂SeO₄ a akumuluje více CFW než rodičovský kmen. Oproti tomu kmen BY4742 *TEF-VPS34* akumuluje méně CFW než rodičovský kmen. Kmen BR-S *TEF-VPS34* akumuluje méně Na₂SeO₄ než rodičovský kmen. Výraznější rozdíly

v citlivosti k inhibitorům jsou mezi jednotlivými rodičovskými kmeny. Zdá se, že zvýšená exprese *VPS34* má mírný pozitivní vliv na fitness kmenů odvozených od BY4742 a BR-S, ale spíše mírně negativní vliv na kmen odvozený od PORT. To je zřejmě způsobeno odlišným genetickým pozadím jednotlivých rodičovských kmenů a s tím spojenými rozdíly v metabolismu.

Tyto výsledky jsou podle databáze SGD prvními publikovanými inhibitorovými testy kmenů se zvýšenou expresí *VPS34* (Cherry *et al.*, 2012).

5.5.8 Amoniaková signalizace a vertikální diferenciaci kolonií u kmenů se zvýšenou expresí *VPS34*

Při narušení PI3K signální dráhy delecí *VPS34* nedochází k sekreci aktivního α -faktoru (Banuelos *et al.*, 2010), je narušena buněčná odpověď na feromon (Slessareva *et al.*, 2006; Heenan *et al.*, 2009) a recyklace a lokalizace senzoru stresu v buněčné stěně – Wsc1p (Ueno *et al.*, 2014). Také nedochází k tvorbě strukturovaných kolonií (Sarode *et al.*, 2011; Adhikari a Cullen, 2015). Vps34p je rovněž zapojen do lokalizace genů v buněčném jádře a do regulace transkripce (Gaur *et al.*, 2013). Protože Vps34p hraje roli v regulaci mnoha jiných signálních drah, očekával jsem, že zvýšená exprese *VPS34* povede ke změnám v amoniakové signalizaci či vertikální diferenciaci kolonií u kmenů s konstruktem *TEF-VPS34*.

U testovaných kmenů BY4742 *TEF-VPS34* a BR-F *TEF-VPS34* nedochází ke změnám v načasování amoniakové signalizace ve srovnání s rodičovskými kmeny. Zdá se však, že kmen BY4742 *TEF-VPS34* produkuje více amoniaku než kmen rodičovský. Bylo by vhodné tuto hypotézu ověřit přesnější metodou, například jímáním amoniaku do jímek s 10% kyselinou citronovou s jeho následným kvantitativním stanovením pomocí Nesslerova činidla.

U kmene BY4742 *TEF-VPS34* rovněž nedochází k viditelným změnám ve vertikální diferenciaci kolonií oproti rodičovskému kmeni.

Pokud vyloučíme možnost, že zvýšená exprese *VPS34* nevede ke zvýšení hladiny Vps34p, je možné, že Vps34p nehraje roli v procesech amoniakové signalizace a vertikální diferenciaci kolonií, nebo je vliv zvýšené exprese *VPS34* kompenzován dalšími regulačními drahami.

5.5.9 Vliv zvýšené exprese *VPS34* na produkci a lokalizaci Flo11p

PI3K signální dráha je nezbytná pro tvorbu strukturovaných kolonií (biofilmů) (Sarode *et al.*, 2011; Adhikari a Cullen, 2015). Pro vývoj těchto kolonií je rovněž nezbytný povrchový

glykoprotein Flo11p (Šťovíček *et al.*, 2010). Sledoval jsem proto, zda zvýšená exprese *VPS34* má vliv na produkci a lokalizaci Flo11p u kmene BR-F Flo11p-GFP.

Pomocí fluorescenční mikroskopie a spektrofluorometru jsem analyzoval lokalizaci a intenzitu fluorescence Flo11p-GFP v buňkách a koloniích u kmene BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* ve srovnání s rodičovským kmenem (při kultivaci na EM, GM a YD). Nazaznamenal jsem však významné změny mezi rodičovským kmenem a kmenem s konstruktem *TEF-VPS34*. Výsledky Western blot analýzy s imunodetekcí Flo11p-GFP pomocí protilátky k GFP neprokázaly rozdíl v hladině Flo11p-GFP mezi 5. a 7. dnem při kultivaci na YD u kmene BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* ve srovnání s rodičovským kmenem. Je však patrný rozdíl při kultivaci 5 dní na EM – kmen BR-F Flo11p-GFP *TEF-VPS34* má ve srovnání s rodičovským kmenem ~5× vyšší intenzitu signálu samotného GFP, což naznačuje, že je zvýšena degradace Flo11p-GFP ve vakuole. Protože tento výsledek je odlišný od výsledků ze 3. a 7. dne, je třeba jej ověřit opakováním experimentu.

Zvýšená exprese *VPS34* pravděpodobně nemá vliv na lokalizaci či produkci Flo11p u kmene BR-F.

5.5.10 Příprava kmenů produkujících Vps34p-GFP

Kmeny produkující Vps34p značený na C-konci pomocí GFP jsem chtěl použít pro sledování produkce Vps34p a jeho lokalizace při růstu a vývoji kolonií při kultivaci na různých médiích a také analyzovat vliv inhibitorů na produkci Vps34p. Tyto kmeny jsem připravoval od rodičovských kmenů BR-F, PORT, BY4742 a Σ^h . Sekvenací jsem ověřil, že kódující úseky *VPS34* i *yEGFP* jsou ve stejném čtecím rámci a proteinová sekvence GFP není mutována.

5.5.11 Morfologie a růst kolonií kmenů produkujících Vps34p-GFP

Morfologie kolonií přírodních diploidních kmenů BR-F Vps34p-GFP a PORT Vps34p-GFP je ve srovnání s rodičovskými kmeny nezměněna.

Morfologie kmene BY4742 Vps34p-GFP je oproti rodičovskému kmeni změněna (kolonie jsou méně strukturované) a oba kmeny se liší i průměrnou plochou kolonií, která je u kmene BY4742 Vps34p-GFP menší. Nelze však vyloučit, že tento rozdíl byl ovlivněn hustším výsevem kmene BY4742 Vps34p-GFP oproti rodičovskému kmeni. Morfologicky i velikostí kolonií je tento kmen určitým přechodem mezi kmeny BY4742 a BY4742 *vps34Δ*.

U kmene Σ^h Vps34p-GFP je morfologie kolonií při kultivaci na YD stejná jako u rodičovského kmene. Morfologie kolonií je při kultivaci na EM podobná rodičovskému kmeni,

avšak zcela odlišná při kultivaci na GM. Schopnost zarůstání do agaru je ve srovnání s rodičovským kmenem významně snížena při kultivaci na YD a GM, ne však na EM. Průměrná plocha kolonií kmene ΣS^h Vps34p-GFP je významně menší než u rodičovského kmene. Průměrnou plochou kolonií je tento kmen mezi kmenem rodičovským a ΣS^h *vps15Δ* (při kultivaci na YD).

Uvedené fenotypy patrné u laboratorních haploidních kmenů jsou zřejmě způsobeny narušením funkce Vps34p, případně problémy při jeho skládání. Na C-konci Vps34p je kinázová (katalytická) doména (Letunic et al., 2015; The UniProt Consortium, 2014). Sekvence 28 aminokyselinových zbytků (837-864) na C-konci Vps34p je klíčová pro vazbu Vps15p (Budovskaya et al., 2002). Je možné, že GFP na C-konci Vps34p snižuje účinnost interakce Vps34p s Vps15p a tím negativně ovlivňuje PI3K aktivitu Vps34p. Na druhou stranu C-koncové značení Vps34p pomocí GFP bylo prokázáno jako funkční při lokalizačních studiích, kdy byl Vps34p-GFP detekován na membránách endozomů (Huh et al., 2003). Protože pro tuto lokalizaci Vps34p je nezbytná vazba na Vps15p (Stack et al., 1993), lze předpokládat, že alespoň část Vps34p je schopná interakce s Vps15p.

5.5.12 Inhibitorové testy kmenů produkujících Vps34p-GFP

U kmenů produkujících Vps34p-GFP odvozených od přírodních diploidních kmenů BR-F a PORT jsem netestoval citlivost k inhibitorům, protože lze očekávat, že případné narušení funkce Vps34p značením jeho C-konce pomocí GFP bude vyváжено produkcí neznačeného Vps34p kódovaného druhou alelou *VPS34*.

Kmen BY4742 Vps34p-GFP má při kultivaci na YD+0,02mM CdSO_4 $10^4\times$ nižší růstovou schopnost ve srovnání s rodičem. Jeho schopnost růstu však není ovlivněna při kultivaci na YD+0,01% SDS nebo na YD při 37 °C.

Kmen ΣS^h Vps34p-GFP je zcela neschopen růstu na YD+0,02mM CdSO_4 (je nejméně $10^4\times$ citlivější než rodičovský kmen), má $10^3\times$ citlivější ve srovnání s rodičem při kultivaci na YD při 37 °C a akumuluje více CuSO_4 než rodičovský kmen.

Tyto výsledky ukazují, že haploidní kmeny produkující Vps34p-GFP jsou citlivější k oxidativnímu stresu než rodičovské kmeny. Tento fenotyp je podobný, ne však tak výrazný jako v případě delece *VPS34*. Oproti kmenům s delecí *VPS15* nebo *VPS34* nejsou kmeny produkující Vps34p-GFP citlivé k detergentům. To vše svědčí o negativním vlivu C-koncového značení Vps34p pomocí GFP na aktivitu Vps34p, nedochází však k úplné inaktivaci Vps34p.

5.5.13 Produkce a lokalizace Vps34p-GFP

Intenzitu a lokalizaci fluorescence jsem sledoval pomocí fluorescenční mikroskopie u kmenů ΣS^h Vps34p-GFP, BY4742 Vps34p-GFP a PORT Vps34p-GFP. Nepozoroval jsem však významné rozdíly v lokalizaci či intenzitě fluorescenčního signálu oproti autofluorescenci u rodičovských kmenů. Ve snaze najít optimální podmínky pro indukci exprese Vps34p jsem zkoušel kmeny produkující Vps34p-GFP kultivovat submerzně i na pevném médiu, s použitím různých zdrojů uhlíku (ethanol, glukóza a glycerol) či v přítomnosti inhibitorů (0,05mM Na_2SeO_4 , 0,02mM CdSO_4 a 0,01% SDS), které jsem zvolil na základě citlivosti haploidních kmenů produkujících Vps34p-GFP k těmto inhibitorům.

Protože jsem nebyl schopen pomocí fluorescenčního mikroskopu odlišit intenzitu autofluorescence od signálu Vps34p-GFP, měřil jsem intenzitu fluorescence monoklonií kmene ΣS^h Vps34p-GFP v maximu GFP ($\lambda = 513 \text{ nm}$) pomocí spektrofluorometru. Nalezl jsem signifikantní rozdíl mezi intenzitou fluorescence tohoto kmene ve srovnání s rodičovským kmenem. Intenzita fluorescence po odečtu pozadí (autofluorescence rodičovského kmene) byla však velmi nízká. Přesto se zdá, že hladina Vps34p je při kultivaci na YD vyšší 7. den než 5. den (o ~50 %), což je zřejmě způsobeno větším počtem buněk produkujících Vps34p-GFP. Tímto způsobem bohužel není možné měřit intenzitu fluorescence kolonií kmene ΣS^h Vps34p-GFP rostoucích na EM či GM, protože na těchto médiích je plocha kolonií příliš malá.

Pomocí Western blot analýzy s imunodetekcí jsem sledoval hladinu Vps34p-GFP u kmene ΣS^h Vps34p-GFP při kultivaci na YD (4., 5., 6. a 7. den) a u kmenů ΣS^h Vps34p-GFP, BY4742 Vps34p-GFP a PORT Vps34p-GFP při kultivaci na médiích s inhibitory. Pro problémy s expozicí filmu při imunodetekci (vysoké pozadí, neexponované oblasti filmu) bylo možné kvantifikovat pouze hladinu Vps34p-GFP u kmene ΣS^h Vps34p-GFP při kultivaci na YD. Podobně jako v případě imunodetekce Flo11p-GFP byly snahy o optimalizaci neúčinné. Výsledky analýzy v programu ImageJ ukazují, že hladina Vps34p-GFP je u kmene ΣS^h Vps34p-GFP nejvyšší 4. den kultivace na YD. Ostatní dny kultivace je hladina Vps34p nižší o ~50 %, v průběhu pozdější kultivace však nedochází k dalším změnám. Tyto výsledky jsou v souladu s pozorováním, že delece *VPS34* má nejvýraznější vliv na průměrnou plochu kolonií do cca 3. dne kultivace.

Vysvětlením problémů s detekcí Vps34p-GFP pomocí fluorescenční mikroskopie či spektrofluorometru je zřejmě nízká hladina Vps34p v buňkách. Tomu nasvědčuje výrazně vyšší intenzita signálu Ino1p-GFP oproti intenzitě signálu Vps34p-GFP při Western blot analýze s imunodetekcí, přestože proteinová nanáška vzorku s Ino1p-GFP byla více než 4× nižší než

u vzorků s Vps34p-GFP. Také v případě Northern blot analýzy musel být expoziční čas pro detekci *VPS15* a *VPS34* přibližně 3× delší než u kontrolních genů *OPI3* a *RPL3*. Data z globálních proteomových analýz ukazují, že v kvasinkové buňce v exponenciální fázi růstu kultivované submerzně v komplexním médiu (YEPD) při 30 °C je přibližně 280 molekul Vps15p a 1080 molekul Vps34p (Ghaemmaghami et al., 2003). Tyto výsledky byly získány analýzou haploidního kmene ATCC 201388 (*MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) a nemusí být přenositelné na všechny kmeny *S. cerevisiae*.

Při C-koncovém značení Vps34p pomocí GFP byl obvykle použit laboratorní haploidní kmen BY4741 (*MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*). Přestože autoři těchto kmenů použili stejně jako já metodu homologní transformace s integrací kazety nesoucí gen pro GFP a rezistenci do genomu, jako templátovou DNA pro přípravu kazet využili jiné plazmidy (Huh et al., 2003; Gaur et al., 2013). Je možné, že jiné plazmidy spolu s jiným rodičovským kmenem a kvalitnějším detekčním systémem jsou důvodem rozdílů v úspěšnosti detekce Vps34p-GFP pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Správnost vložení *yEGFP* za *VPS34* při zachování čtecího rámce u připravených kmenů jsem ověřil pomocí sekvenace, stejně jako správnost proteinové sekvence kódované *yEGFP*. Produkci Vps34p-GFP jsem ověřil pomocí Western blot analýzy s imunodetekcí. Lze tedy předpokládat, že absence, respektive velmi nízký fluorescenční signál Vps34p-GFP není způsoben absencí produkce Vps34p-GFP nebo mutací sekvence *yEGFP*.

Nízká hladina Vps34p v buňkách testovaných kmenů a zhoršené růstové schopnosti laboratorních haploidních kmenů produkujících Vps34p-GFP zabránily v provedení podrobnější analýzy produkce Vps34p a jeho lokalizace při růstu a vývoji kolonií při kultivaci na různých médiích, včetně vlivu inhibitorů.

5.5.14 Srovnání výsledků bioinformatických analýz a experimentální části práce

Buněčné procesy spojené s Vps15p nebo Vps34p nalezené při bioinformatických analýzách (buněčná odpověď na stres, buněčný cyklus, filamentární růst, odpověď na dostupnost živin, organizace chromozomů a udržování telomer) odpovídají pozorovaným fenotypům u kmenů s narušením PI3K signální dráhy delecí *VPS15* nebo *VPS34*, částečnou inaktivací Vps34p C-koncovým značením pomocí GFP (inhibice růstu, změny morfologie kolonií, snížení či absence filamentárního růstu a zvýšená citlivost k oxidativnímu stresu a detergentům) nebo zvýšenou expresí *VPS34* (změny morfologie kolonií a zvýšený filamentární růst).

6 Souhrn

- Vytvořil jsem kmeny *Saccharomyces cerevisiae* s delecí genů PI3K signální dráhy (*VPS15* a *VPS34*) odvozené od laboratorních haploidních kmenů BY4742 a Σ^h – BY4742 *vps15Δ*, BY4742 *vps34Δ* a Σ^h *vps15Δ*. Kmeny s delecí *VPS34* odvozené od přírodních diploidních kmenů BR-F, BR-F Flo11p-GFP a PORT a od laboratorního kmene Σ^h se nepodařilo připravit, pravděpodobně z důvodu esenciality *VPS34* u těchto kmenů.
- Inhibitor savčího proteinu Vps34 (KU-55933) nemá při koncentraci, která je 5× vyšší než koncentrace používaná pro savčí buňky, vliv na aktivitu Vps34p kvasinky *S. cerevisiae*.
- Delece genů PI3K signální dráhy má významný negativní vliv na rychlost růstu, velikost a morfologii kolonií a u kmene Σ^h *vps15Δ* vede k inhibici invazivního růstu. U všech delečních kmenů je výrazně zvýšena citlivost k oxidativnímu stresu a k detergentům.
- Vytvořil jsem kmeny s konstitutivní expresí *VPS34* odvozené od laboratorních haploidních kmenů BY4742 a Σ^h a přírodních diploidních kmenů BR-F, BR-F Flo11p-GFP, BR-S a PORT. Pomocí Northern blot analýzy jsem ověřil funkčnost konstruktů *TEF-VPS34*.
- Zvýšená exprese *VPS34* vede u kmenů odvozených od BR-F a PORT ke změnám v morfologii kolonií a způsobu zarůstání do agaru, ne však u kmenů odvozených od BY4742 a BR-S. U žádného z testovaných kmenů nemá zvýšená exprese *VPS34* vliv na velikost kolonií, morfologii buněk nebo citlivost k inhibitorům ve srovnání s rodičovskými kmeny.
- Připravil jsem kmeny produkující Vps34p-GFP odvozené od kmenů BY4742, Σ^h , BR-F a PORT. Hladina Vps34p-GFP je však u těchto kmenů příliš nízká pro studie s využitím fluorescenční mikroskopie. C-koncové značení Vps34p pomocí GFP má negativní vliv na funkci Vps34p a u haploidních kmenů vede k fenotypu připomínajícímu delecí *VPS34*. To znemožnilo využití laboratorních kmenů pro analýzu produkce Vps34p při růstu a vývoji kolonií.
- Experimentální výsledky získané v rámci této práce jsou v souladu s provedenými bioinformatickými analýzami funkce Vps15p a Vps34p u *S. cerevisiae*.

7 Seznam použité literatury

- Adhikari, H., and Cullen, P.J. (2015). Role of Phosphatidylinositol Phosphate Signaling in the Regulation of the Filamentous-Growth Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Eukaryotic Cell* 14, 427-440.
- Albuquerque, C.P., Smolka, M.B., Payne, S.H., Bafna, V., Eng, J., and Zhou, H. (2008). A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Molecular & Cellular Proteomics* 7, 1389-1396.
- Apweiler, R., Bateman, A., Martin, M.J., O'Donovan, C., Magrane, M., Alam-Faruque, Y., Alpi, E., Antunes, R., Arganiska, J., Casanova, E.B., *et al.* (2014). Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research* 42, D191-D198.
- Araki, Y., Ku, W.-C., Akioka, M., May, A.I., Hayashi, Y., Arisaka, F., Ishihama, Y., and Ohsumi, Y. (2013). Atg38 is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity. *Journal of Cell Biology* 203, 299-313.
- Auger, K.R., Carpenter, C.L., Cantley, L.C., and Varticovski, L. (1989). Phosphatidylinositol 3-Kinase and Its Novel Product, Phosphatidylinositol 3-Phosphate, Are Present in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 264, 20181-20184.
- Backer, J.M. (2008). The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochemical Journal* 410, 1-17.
- Banta, L.M., Robinson, J.S., Klionsky, D.J., and Emr, S.D. (1988). Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting. *Journal of Cell Biology* 107, 1369-1383.
- Banuelos, M.G., Moreno, D.E., Olson, D.K., Nguyen, Q., Ricarte, F., Aguilera-Sandoval, C.R., and Gharakhanian, E. (2010). Genomic analysis of severe hypersensitivity to hygromycin B reveals linkage to vacuolar defects and new vacuolar gene functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 56, 121-137.
- Bodenmiller, B., Campbell, D., Gerrits, B., Lam, H., Jovanovic, M., Picotti, P., Schlapbach, R., and Aebersold, R. (2008). PhosphoPep-a database of protein phosphorylation sites in model organisms. *Nature Biotechnology* 26, 1339-1340.
- Bodenmiller, B., Wanka, S., Kraft, C., Urban, J., Campbell, D., Pedrioli, P.G., Gerrits, B., Picotti, P., Lam, H., Vitek, O., *et al.* (2010). Phosphoproteomic Analysis Reveals Interconnected System-Wide Responses to Perturbations of Kinases and Phosphatases in Yeast. *Science Signaling* 3.
- Bravo, J., Karathanassis, D., Pacold, C.M., Pacold, M.E., Ellson, C.D., Anderson, K.E., Butler, P.J.G., Lavenir, I., Perisic, O., Hawkins, P.T., *et al.* (2001). The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate. *Molecular Cell* 8, 829-839.
- Bruckmann, A., Kunkel, W., Hartl, A., Wetzker, R., and Eck, R. (2000). A phosphatidylinositol 3-kinase of *Candida albicans* influences adhesion, filamentous growth and virulence. *Microbiology-Uk* 146, 2755-2764.
- Budovskaya, Y.V., Hama, H., DeWald, D.B., and Herman, P.K. (2002). The C terminus of the Vps34p phosphoinositide 3-kinase is necessary and sufficient for the interaction with the Vps15p protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 277, 287-294.
- Burd, C.G., and Emr, S.D. (1998). Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Molecular Cell* 2, 157-162.
- Burd, C.G., Peterson, M., Cowles, C.R., and Emr, S.D. (1997). A novel Sec18p/NSF-dependent complex required for Golgi-to-endosome transport in yeast. *Molecular Biology of the Cell* 8, 1089-1104.
- Cap, M., Stepanek, L., Harant, K., Vachova, L., and Palkova, Z. (2012). Cell Differentiation within a Yeast Colony: Metabolic and Regulatory Parallels with a Tumor-Affected Organism. *Molecular Cell* 46, 436-448.
- Cervelli, T., and Galli, A. (2000). Effects of HDF1 (Ku70) and HDF2 (Ku80) on spontaneous and DNA damage-induced intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics* 264, 56-63.
- Chatr-aryamontri, A., Breitkreutz, B.-J., Heinicke, S., Boucher, L., Winter, A., Stark, C., Nixon, J., Ramage, L., Kolas, N., O'Donnell, L., *et al.* (2013). The BioGRID interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Research* 41, D816-D823.

- Cherry, J.M., Hong, E.L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E.T., Christie, K.R., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Engel, S.R., *et al.* (2012). *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Research* 40, D700-D705.
- Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D., and Schroeder, J.I. (1999). Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *Embo Journal* 18, 3325-3333.
- de Boer, C.G., and Hughes, T.R. (2012). YeTFaSCo: a database of evaluated yeast transcription factor sequence specificities. *Nucleic Acids Research* 40, D169-D179.
- Domin, J., and Waterfield, M.D. (1997). Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *Febs Letters* 410, 91-95.
- Douglas, L.J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology* 11, 30-36.
- Dowell, R.D., Ryan, O., Jansen, A., Cheung, D., Agarwala, S., Danford, T., Bernstein, D.A., Rolfe, P.A., Heisler, L.E., Chin, B., *et al.* (2010). Genotype to Phenotype: A Complex Problem. *Science* 328, 469-469.
- Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics* 7, 606-619.
- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., and Subramaniam, S. (2011). Lipid classification, structures and tools. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811, 637-647.
- Farkas, T., Dagaard, M., and Jaattela, M. (2011). Identification of Small Molecule Inhibitors of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 286, 38904-38912.
- Fruman, D.A., Meyers, R.E., and Cantley, L.C. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annual Review of Biochemistry* 67, 481-507.
- Furuya, T., Kim, M., Lipinski, M., Li, J., Kim, D., Lu, T., Shen, Y., Rameh, L., Yankner, B., Tsai, L.-H., *et al.* (2010). Negative Regulation of Vps34 by Cdk Mediated Phosphorylation. *Molecular Cell* 38, 500-511.
- Gary, J.D., Wurmser, A.E., Bonangelino, C.J., Weisman, L.S., and Emr, S.D. (1998). Fab1p is essential for PtdIns(3)P 5-kinase activity and the maintenance of vacuolar size and membrane homeostasis. *Journal of Cell Biology* 143, 65-79.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell* 11, 4241-4257.
- Gaullier, J.M., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B., and Stenmark, H. (1999). FYVE finger proteins as effectors of phosphatidylinositol 3-phosphate. *Chemistry and Physics of Lipids* 98, 87-94.
- Gaullier, J.M., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B., Stenmark, H., and Aasland, R. (1998). FYVE fingers bind Ptdins(3)P. *Nature* 394, 432-433.
- Gaur, N.A., Hasek, J., Brickner, D.G., Qiu, H., Zhang, F., Wong, C.-M., Malcova, I., Vasicova, P., Brickner, J.H., and Hinnebusch, A.G. (2013). Vps Factors Are Required for Efficient Transcription Elongation in Budding Yeast. *Genetics* 193, 829-851.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., and Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737-741.
- Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Pt B* 350, 87-96.
- Gillooly, D.J., Simonsen, A., and Stenmark, H. (2001). Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins. *Biochemical Journal* 355, 249-258.
- Greenberg, M.L., and Lopes, J.M. (1996). Genetic regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* 60, 1-20.
- Grunau, S., Lay, D., Mindthoff, S., Platta, H.W., Girzalsky, W., Just, W.W., and Erdmann, R. (2011). The phosphoinositide 3-kinase Vps34p is required for pexophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal* 434, 161-170.
- Han, B.-K., and Emr, S.D. (2011). Phosphoinositide PI(3,5)P-2 lipid-dependent regulation of the general transcriptional regulator Tup1. *Genes & Development* 25, 984-995.

- Han, B.-K., and Emr, S.D. (2013). The Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate (PI(3,5)P₂)-dependent Tup1 Conversion (PIPTC) Regulates Metabolic Reprogramming from Glycolysis to Gluconeogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 288, 20633-20645.
- Heenan, E.J., Vanhooke, J.L., Temple, B.R., Betts, L., Sondek, J.E., and Dohlman, H.G. (2009). Structure and Function of Vps15 in the Endosomal G Protein Signaling Pathway. *Biochemistry* 48, 6390-6401.
- Helbig, A.O., Rosati, S., Pijnappel, P.W.W.M., van Breukelen, B., Timmers, M.H.T.H., Mohammed, S., Slijper, M., and Heck, A.J.R. (2010). Perturbation of the yeast N-acetyltransferase NatB induces elevation of protein phosphorylation levels. *Bmc Genomics* 11.
- Herman, P.K., and Emr, S.D. (1990). Characterization of *VPS34*, a Gene Required for Vacuolar Protein Sorting and Vacuole Segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 10, 6742-6754.
- Herman, P.K., Stack, J.H., and Emr, S.D. (1991). A genetic and structural analysis of the yeast Vps15 protein kinase: evidence for a direct role of Vps15p in vacuolar protein delivery. *Embo Journal* 10, 4049-4060.
- Hickson, I., Yan, Z., Richardson, C.J., Green, S.J., Martin, N.M.B., Orr, A.I., Reaper, P.M., Jackson, S.P., Curtin, N.J., and Smith, G.C.M. (2004). Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Research* 64, 9152-9159.
- Hiles, I.D., Otsu, M., Volinia, S., Fry, M.J., Gout, I., Dhand, R., Panayotou, G., Ruizlarrea, F., Thompson, A., Totty, N.F., *et al.* (1992). Phosphatidylinositol 3-Kinase: Structure and Expression of the 110 kd Catalytic Subunit. *Cell* 70, 419-429.
- Hiroaki, H., Ago, T., Ito, T., Sumimoto, H., and Kohda, D. (2001). Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain. *Nature Structural Biology* 8, 526-530.
- Hu, G., Hacham, M., Waterman, S.R., Panepinto, J., Shin, S., Liu, X., Gibbons, J., Valyi-Nagy, T., Obara, K., Jaffe, H.A., *et al.* (2008). PI3K signaling of autophagy is required for starvation tolerance and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Investigation* 118, 1186-1197.
- Huang, C.-H., Mandelker, D., Schmidt-Kittler, O., Samuels, Y., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Gabbelli, S.B., and Amzel, L.M. (2007). The structure of a human p110 alpha/p85 alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3K alpha mutations. *Science* 318, 1744-1748.
- Huber, A., Bodenmiller, B., Uotila, A., Stahl, M., Wanka, S., Gerrits, B., Aebersold, R., and Loewith, R. (2009). Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes & Development* 23, 1929-1943.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
- Jaber, N., Dou, Z., Chen, J.-S., Catanzaro, J., Jiang, Y.-P., Ballou, L.M., Selinger, E., Ouyang, X., Lin, R.Z., Zhang, J., *et al.* (2012). Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 2003-2008.
- Kelley, M.J., Bailis, A.M., Henry, S.A., and Carman, G.M. (1988). Regulation of Phospholipid Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by Inositol – Inositol Is an Inhibitor of Phosphatidylserine Synthase Activity. *Journal of Biological Chemistry* 263, 18078-18085.
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* 152, 519-530.
- Kimura, K., Miyake, S., Makuuchi, M., Morita, R., Usui, T., Yoshida, M., Horinouchi, S., and Fukui, Y. (1995). Phosphatidylinositol-3 Kinase in Fission Yeast: A Possible Role in Stress Responses. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59, 678-682.
- King, L., and Butler, G. (1998). Ace2p, a regulator of CTS1 (chitinase) expression, affects pseudohyphal production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 34, 183-191.
- Kitanovic, A., Nguyen, M., Vogl, G., Hartmann, A., Gunther, J., Wurzner, R., Kunkel, W., Wolfl, S., and Eck, R. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase VPS34 of *Candida albicans* is involved in filamentous growth, secretion of aspartic proteases, and intracellular detoxification. *Fems Yeast Research* 5, 431-439.
- Klug, L., and Daum, G. (2014). Yeast lipid metabolism at a glance. *Fems Yeast Research* 14, 369-388.
- Komada, M., Masaki, R., Yamamoto, A., and Kitamura, N. (1997). Hrs, a tyrosine kinase substrate with a conserved

double zinc finger domain, is localized to the cytoplasmic surface of early endosomes. *Journal of Biological Chemistry* 272, 20538-20544.

Krick, R., Henke, S., Tolstrup, J., and Thumm, M. (2008). Dissecting the localization and function of Atg18, Atg21 and Ygr223c. *Autophagy* 4, 896-910.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., *et al.* (2007). Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.

Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P. (2015). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Research* 43, D257-D260.

Lewinska, A., Miedziak, B., and Wnuk, M. (2014). Assessment of yeast chromosome XII instability: Single chromosome comet assay. *Fungal Genetics and Biology* 63, 9-16.

Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G.R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939-949.

Lorenz, M.C., and Heitman, J. (1998). Regulators of pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains. *Genetics* 150, 1443-1457.

Lu, Q., Wallrath, L.L., and Elgin, S.C.R. (1994). Nucleosome positioning and gene regulation. *Journal of Cellular Biochemistry* 55, 83-92.

Lynch, A.S., and Robertson, G.T. (2008). Bacterial and fungal biofilm infections. *Annual Review of Medicine* 59, 415-428.

Manikova, D., Vlasakova, D., Letavayova, L., Klobucnikova, V., Griac, P., and Chovanec, M. (2012). Selenium Toxicity toward Yeast as Assessed by Microarray Analysis and Deletion Mutant Library Screen: A Role for DNA Repair. *Chemical Research in Toxicology* 25, 1598-1608.

Merz, S., and Westermann, B. (2009). Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biology* 10, R95.1-17.

Milne, G.T., Jin, S.F., Shannon, K.B., and Weaver, D.T. (1996). Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 16, 4189-4198.

Misra, S., and Hurley, J.H. (1999). Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell* 97, 657-666.

Morel, E., Chamoun, Z., Lasiecka, Z.M., Chan, R.B., Williamson, R.L., Vetanovetz, C., Dall'Armi, C., Simoes, S., Du Jour, K.S.P., McCabe, B.D., *et al.* (2013). Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system. *Nature Communications* 4.

Murata, Y., Watanabe, T., Sato, M., Momose, Y., Nakahara, T., Oka, S., and Iwahashi, H. (2003). Dimethyl sulfoxide exposure facilitates phospholipid biosynthesis and cellular membrane proliferation in yeast cells. *Journal of Biological Chemistry* 278, 33185-33193.

Nicot, A.-S., and Laporte, J. (2008). Endosomal phosphoinositides and human diseases. *Traffic* 9, 1240-1249.

Nishizawa, M., Kanaya, Y., and Toh-e, A. (1999). Mouse cyclin-dependent kinase (Cdk) 5 is a functional homologue of a yeast Cdk, Pho85 kinase. *Journal of Biological Chemistry* 274, 33859-33862.

Obara, K., Sekito, T., and Ohsumi, Y. (2006). Assortment of phosphatidylinositol 3-kinase complexes-Atg14p directs association of complex I to the pre-autophagosomal structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 17, 1527-1539.

Ohya, Y., Umemoto, N., Tanida, I., Ohta, A., Iida, H., and Anraku, Y. (1991). Calcium-sensitive *cls* Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Showing a Pet Phenotype Are Ascribable to Defects of Vacuolar Membrane H⁺-ATPase Activity. *Journal of Biological Chemistry* 266, 13971-13977.

Palkova, Z., Janderova, B., Gabriel, J., Zikanova, B., Pospisek, M., and Forstova, J. (1997). Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390, 532-536.

Plano, D., Ibanez, E., Calvo, A., Antonio Palop, J., and Sanmartin, C. (2011). Novel Library of Selenocompounds as Kinase Modulators. *Molecules* 16, 6349-6364.

Ponting, C.P. (1996). Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: Binding partners of SH3 domains? *Protein Science* 5, 2353-2357.

- Pringle, A.T., and Rose, A.H. (1979). Phospholipid Composition and the Effect of Sodium Dodecyl Sulphate on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 111, 337-342.
- Raymond, C.K., Howald-stevenson, I., Vater, C.A., and Stevens, T.H. (1992). Morphological Classification of the Yeast Vacuolar Protein Sorting Mutants: Evidence for a Prevacuolar Compartment in Class E *vps* Mutants. *Molecular Biology of the Cell* 3, 1389-1402.
- Robinson, J.S., Klionsky, D.J., Banta, L.M., and Emr, S.D. (1988). Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Molecular and Cellular Biology* 8, 4936-4948.
- Rog, O., Smolikov, S., Krauskopf, A., and Kupiec, M. (2005). The yeast VPS genes affect telomere length regulation. *Current Genetics* 47, 18-28.
- Rottensteiner, H., Kal, A.J., Hamilton, B., Ruis, H., and Tabak, H.F. (1997). A heterodimer of the Zn(2)Cys(6) transcription factors Pip2p and Oaf1p controls induction of genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 247, 776-783.
- Sambade, M., Alba, M., Smardon, A.M., West, R.W., and Kane, P.M. (2005). Genomic screen for yeast vacuolar membrane ATPase mutants. *Genetics* 170, 1539-1551.
- Sarode, N., Miracle, B., Peng, X., Ryan, O., and Reynolds, T.B. (2011). Vacuolar Protein Sorting Genes Regulate Mat Formation in *Saccharomyces cerevisiae* by Flo11p-Dependent and -Independent Mechanisms. *Eukaryotic Cell* 10, 1516-1526.
- Schier, J., and Kovar, B. (2011). Automated counting of yeast colonies using the fast radial transform algorithm. *Bioinformatics* 27, 22-27.
- Schu, P.V., Takegawa, K., Fry, M.J., Stack, J.H., Waterfield, M.D., and Emr, S.D. (1993). Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 260, 88-91.
- Shaw, J.D., Hama, H., Sohrabi, F., DeWald, D.B., and Wendland, B. (2003). PtdIns(3,5)P-2 is required for delivery of endocytic cargo into the multivesicular body. *Traffic* 4, 479-490.
- Slessareva, J.E., Routt, S.M., Temple, B., Bankaitis, V.A., and Dohlman, H.G. (2006). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein alpha subunit at the endosome. *Cell* 126, 191-203.
- Stack, J.H., Dewald, D.B., Takegawa, K., and Emr, S.D. (1995). Vesicle-mediated Protein Transport: Regulatory Interactions between the Vps15 Protein Kinase and the Vps34 PtdIns 3-Kinase Essential for Protein Sorting to the Vacuole in Yeast. *Journal of Cell Biology* 129, 321-334.
- Stack, J.H., and Emr, S.D. (1994). Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase activities. *Journal of Biological Chemistry* 269, 31552-31562.
- Stack, J.H., Herman, P.K., Schu, P.V., and Emr, S.D. (1993). A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *Embo Journal* 12, 2195-2204.
- Stenmark, H., Aasland, R., Toh, B.H., and Darrigo, A. (1996). Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *Journal of Biological Chemistry* 271, 24048-24054.
- Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28, 1102-+.
- Stovicek, V., Vachova, L., Kuthan, M., and Palkova, Z. (2010). General factors important for the formation of structured biofilm-like yeast colonies. *Fungal Genetics and Biology* 47, 1012-1022.
- Strahl, T., and Thorner, J. (2007). Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771, 353-404.
- Stromhaug, P.E., Reggiori, F., Guan, J., Wang, C.W., and Klionsky, D.J. (2004). Atg21 is a phosphoinositide binding protein required for efficient lipidation and localization of Atg8 during uptake of aminopeptidase I by selective autophagy. *Molecular Biology of the Cell* 15, 3553-3566.
- Tan, Z., Hays, M., Cromie, G.A., Jeffery, E.W., Scott, A.C., Ah Yong, V., Sirr, A., Skupin, A., and Dudley, A.M. (2013). Aneuploidy underlies a multicellular phenotypic switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 12367-12372.

- Teixeira, M.C., Monteiro, P.T., Guerreiro, J.F., Goncalves, J.P., Mira, N.P., dos Santos, S.C., Cabrito, T.R., Palma, M., Costa, C., Francisco, A.P., *et al.* (2014). The YEASTRACT database: an upgraded information system for the analysis of gene and genomic transcription regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* *42*, D161-D166.
- Ueno, K., Saito, M., Nagashima, M., Kojima, A., Nishinoaki, S., Toshima, J.Y., and Toshima, J. (2014). V-ATPase-dependent luminal acidification is required for endocytic recycling of a yeast cell wall stress sensor, Wsc1p. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *443*, 549-555.
- Vachova, L., Kuceroval, H., Devaux, F., Ulehlova, M., and Palkova, Z. (2009). Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environmental Microbiology* *11*, 494-504.
- van Zutphen, T., Todde, V., de Boer, R., Kreim, M., Hofbauer, H.F., Wolinski, H., Veenhuis, M., van der Klei, I.J., and Kohlwein, S.D. (2014). Lipid droplet autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* *25*, 290-301.
- Vollert, C.S., and Uetz, P. (2004). The phox homology (PX) domain protein interaction network in yeast. *Molecular & Cellular Proteomics* *3*, 1053-1064.
- Wang, Z., Wilson, W.A., Fujino, M.A., and Roach, P.J. (2001). Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p. *Molecular and Cellular Biology* *21*, 5742-5752.
- Wurmser, A.E., and Emr, S.D. (2002). Novel PtdIns(3)P-binding protein Etf1 functions as an effector of the Vps34 PtdIns 3-kinase in autophagy. *Journal of Cell Biology* *158*, 761-772.
- Wymann, M.P., and Pirola, L. (1998). Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* *1436*, 127-150.
- Xiao, J., Zhang, T., Xu, D.C., Wang, H.B., Cai, Y., Jin, T.J., Liu, M., Jin, M.Z., Wu, K.J., and Yuan, J.Y. (2015). FBXL20-mediated Vps34 ubiquitination as a p53 controlled checkpoint in regulating autophagy and receptor degradation. *Genes & Development* *29*, 184-196.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods* *12*, 7-8.
- Yen, W.-L., Legakis, J.E., Nair, U., and Klionsky, D.J. (2007). Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9. *Molecular Biology of the Cell* *18*, 581-593.
- Yoshida, S., and Anraku, Y. (2000). Characterization of staurosporine-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: vacuolar functions affect staurosporine sensitivity. *Molecular and General Genetics* *263*, 877-888.
- Yu, J.W., and Lemmon, M.A. (2001). All phox homology (PX) domains from *Saccharomyces cerevisiae* specifically recognize phosphatidylinositol 3-phosphate. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 44179-44184.
- Zewail, A., Xie, M.W., Xing, Y., Lin, L., Zhang, P.F., Zou, W., Saxe, J.P., and Huang, J. (2003). Novel functions of the phosphatidylinositol metabolic pathway discovered by a chemical genomics screen with wortmannin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 3345-3350.
- Zinser, E., Sperkagottlieb, C.D.M., Fasch, E.V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F., and Daum, G. (1991). Phospholipid Synthesis and Lipid Composition of Subcellular Membranes in the Unicellular Eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *E. Journal of Bacteriology* *173*, 2026-2034.